

Université de Montréal

**Étude de l'association entre peptides et micelles typiques
ou polymériques effectuée par spectroscopie UV/VIS et
par MEKC**

Par

Carl Hémond

Département de Chimie

Faculté des Arts et des Sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maîtrise ès sciences (M. Sc.)
en chimie

Août 2003

© Carl Hémond, 2003



AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Étude de l'association entre peptides et micelles typiques
ou polymériques effectuée par spectroscopie UV/VIS et
par MEKC**

présenté par :
Carl Hémond

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Marius D'Amboise	président-rapporteur
Dr. Karen C. Waldron	directrice de recherche
Dr. Sébastien Sauvé	membre du jury

Sommaire

L'intérêt des études sur l'interaction entre une série de peptides et un agent micellant donné, porte généralement sur la détermination de la valeur relative des constantes d'association apparentes (K_{as}), plutôt que sur leur valeur absolue. La fiabilité d'une méthode à déterminer les K_{as} est donc rarement considérée, en raison de la variation des conditions expérimentales pouvant se produire à l'intérieur de la même technique analytique. Il est toutefois important de savoir si les K_{as} obtenues par des méthodes électrophorétiques sont comparables à celles obtenues par une autre technique instrumentale. Dans cette étude, l'électrophorèse capillaire (CE) en milieu micellaire (MEKC) a été comparée à la spectroscopie d'absorption afin d'estimer les K_{as} de systèmes peptides-micelles pour trois petits peptides sous les conditions suivantes : solution aqueuse tamponnée à pH 4,1 pour les études des interactions avec le CTAB et 7,0 et 8,1 pour les études des interactions avec le SDS à des températures de 25°C, 20°C et 33°C. Les deux méthodes ont donné des valeurs similaires de K_{as} pour les trois systèmes peptides-micelles de dodécyl sulfate de sodium (SDS) avec des valeurs allant de $12 \pm 3 \text{ M}^{-1}$ à $38,6 \pm 0,7 \text{ M}^{-1}$. Dans le cas des deux méthodes utilisées, les K_{as} du système Leu-Phe en présence de micelles de bromure de cétyltriméthylammonium (CTAB) étaient du même ordre de grandeur que celles obtenues avec les micelles de SDS. D'autre part, l'association enképhaline-micelle de CTAB était à peu près 10 fois plus forte ($K_{as} = 122 \pm 3 \text{ M}^{-1}$ à $311 \pm 9 \text{ M}^{-1}$) que l'association enképhaline-micelle de SDS. De plus, la MEKC sous-estime les valeurs de K_{as} , par rapport à la spectroscopie par un facteur de 2-3 pour les systèmes enképhaline-CTAB.

Une certaine difficulté s'est manifestée lors de la détermination de la concentration micellaire critique (CMC) des surfactants, révélant ainsi la dégradation du SDS en fonction du temps. Une série d'études a donc été réalisée afin d'évaluer l'effet de ce comportement du SDS sur la mobilité effective des peptides utilisés en MEKC. Étant donné que deux de nos peptides ont deux résidus aromatiques (phénylalanine et tyrosine), nous voulions identifier celui qui

est impliqué dans l'association avec les micelles. La spectroscopie d'absorption a permis d'évaluer séparément la contribution de deux résidus aromatiques présents dans le même peptide en utilisant la troisième dérivée du spectre UV/Vis. La comparaison des constantes d'association ainsi obtenues a démontré que la phénylalanine interagit beaucoup plus avec la phase micellaire ($K_{as(Phe)} : 310 \pm 40 \text{ M}^{-1}$) que la tyrosine, qui a plutôt des interactions avec la surface de la micelle de CTAB ($K_{as(Tyr)} 170 \pm 10 \text{ M}^{-1}$). Dans le cas des micelles de SDS, les résidus de Met-enképhaline ne s'insèrent pas dans la phase micellaire. Les constantes d'association obtenues reflètent donc le changement de conformation du peptide et permettent de vérifier que les résidus aromatiques interagissent conformément à une étude réalisée par RMN qui a été publiée en 2001.

Pour déterminer la constante d'association apparente, une relation mathématique impliquant la variation de la mobilité en MEKC ou du maximum de la longueur d'onde en spectrophotométrie UV/Vis en fonction de la concentration en agent micellant est utilisée. De façon similaire, les interactions entre des peptides et des polyélectrolytes ont été mesurées par électrophorèse capillaire. Nous avons proposé que des stoechiométries d'association 1:1 et 1:2 se produisant simultanément entre le peptide et le copolymère décrivaient le mieux les résultats observés ($I = 110 \text{ mM}$ phosphate de sodium, pH 2,0, 25°C).

Mots clefs : Spectroscopie d'absorption / Constante d'association / Chromatographie électrocinétique capillaire / Micelle / Peptide / Polyélectrolyte / Micelle unimoléculaire / Enképhaline / Électrophorèse capillaire

Abstract

The relative, rather than absolute, binding strengths of a series of peptides with a given binding agent are normally sought after in a study. Thus the reliability of a method to accurately determine equilibrium association constants, K_{as} , is rarely considered, particularly because experimental conditions can vary widely even within the same measurement technique. Nonetheless, it is important to know whether K_{as} obtained by electrophoretic-based methods are meaningful by comparing K_{as} values for a given chemical interaction with those obtained by another instrumental technique, keeping in mind that each method interrogates a different property and can thus bias the K_{as} estimation. In this study, micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC) was compared to absorption spectroscopy to estimate K_{as} for peptide-micelle systems using three small peptides under the following conditions: aqueous solutions buffered at pH 4.1 for CTAB interactions and at 7.0 and 8.1 for SDS at temperatures of 25°C, 20°C and 33°C. Viscosity-corrected MEKC mobilities gave reasonably similar estimates of K_{as} between the two methods for all three peptide-sodium dodecyl sulfate (SDS) micelle systems, with K_{as} values ranging from $12 \pm 3 \text{ M}^{-1}$ to $38,6 \pm 0,7 \text{ M}^{-1}$. For cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), estimates of K_{as} for Leu-Phe with CTAB micelles association were of the same order of magnitude as the SDS micelles by the two methods of estimation. On the other hand, enkephalin-CTAB micelle binding was about 10 times stronger ($K_{as} = 122 \pm 3 \text{ M}^{-1}$ to $311 \pm 9 \text{ M}^{-1}$) than the enkephalin-SDS micelle binding. In addition, MEKC underestimated the K_{as} values relative to spectroscopy by a factor of 2–3 for the enkephalin-CTAB system.

Problems arising during the critical micellar concentration (CMC) determination showed evidence of SDS degradation over time. A series of studies were done to evaluate the behaviour and age of SDS buffer solutions on the effective mobility of the peptides used in MEKC. Because two of our peptides have two aromatic residues (phenylalanine and tyrosine), we wanted to know whether one of them was preferentially involved during the binding with

the micelles. Using spectroscopy, the contribution of two different aromatic side chains present in the same peptide could be evaluated separately by using the first or third derivative of the UV/Vis spectrum. A comparison of the constants showed that phenylalanine interacted more strongly with the micellar phase ($K_{as(Phe)} : 310 \pm 40 \text{ M}^{-1}$) while tyrosine interactions were mostly located at the surface of the CTAB micelle ($K_{as(Tyr)} 170 \pm 10 \text{ M}^{-1}$). In the case of SDS micelles, the Met-enkephalin residues are not inserted into the micellar phase. In this case, the association constants reflected the change of conformation of the peptide and they confirmed that the residues interact together rather than with the micelles, as shown by NMR studies published in 2001.

Similarly, the affinity of peptides for polyelectrolytes was measured by capillary electrophoretic techniques in an attempt to identify and quantify the interactions involved. To determine the apparent binding constant, mathematical relationships involving the variation of mobility (MEKC) or wavelength maximum (spectrometry) as a function of increasing additive concentration were used. We proposed that two binding stoichiometries 1:1 and 1:2 occurring simultaneously between the peptide analyte and the copolymer best described the observed data ($I = 110 \text{ mM}$ sodium phosphate, pH 2.0, 25°C).

Keywords: Absorption spectroscopy / Association constant / Binding constant / Electrokinetic capillary chromatography / Micelle / Peptide / Polyelectrolyte / Unimolecular micelle / Enkephalin / Capillary electrophoresis

Table des matières

Sommaire.....	i
Abstract	iii
Table des matières	v
Liste des tableaux	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations	xii
Remerciements	xiv
1. Introduction générale.....	1
1.1 Importance de la détermination des constantes d'association.....	2
1.2 Calcul des constantes d'association	3
1.2.1 Électrophorèse capillaire.....	3
1.2.2 Spectrophotométrie d'absorption.....	8
1.3 Objectifs du projet.....	9
2. A comparison between electrokinetic capillary chromatography and absorption spectroscopy for the analysis of peptide-micelle association by weak hydrophobic interactions'	11
2.1 Introduction	13
2.2 Materials and methods.....	15
2.2.1 Materials.....	15
2.2.2 Buffer and sample preparation	16
2.2.3 Absorption spectroscopy methods	16
2.2.4 Capillary electrophoresis methods	18
2.3 Results and discussion.....	20
Analyte	23
2.4 Conclusions	28
2.5 Annexe.....	29
3. Comportement des solutions micellaires lors des études faites par électrophorèse capillaire.....	36
3.1 Introduction	37

3.2	Théorie.....	38
3.2.1	Hydrolyse du SDS.....	38
3.2.2	Détermination de la CMC	39
3.2.3	Détermination du facteur de correction de la viscosité.....	39
3.3	Matériels et méthodes.....	41
3.3.1	Provenance des produits.....	41
3.3.2	Préparation des tampons et des échantillons.....	41
3.3.3	Électrophorèse capillaire.....	42
3.4	Résultats et discussion.....	43
3.5	Conclusion.....	49
4.	Comparaison des constantes d'association obtenues à partir de chacun des chromophores présents dans la Met-enképhaline	52
4.1	Introduction	53
4.2	Matériels et méthodes.....	54
4.2.1	Provenance des produits.....	54
4.2.2	Préparation des tampons et des échantillons.....	55
4.2.3	Spectrophotométrie UV-Visible différentielle.....	55
4.3	Résultats et discussion.....	56
4.4	Conclusion.....	60
5.	Étude des interactions peptides-micelles polymériques par électrophorèse capillaire.....	62
5.1	Introduction	63
5.2	Matériels et méthodes.....	66
5.2.1	Provenance des produits.....	66
5.2.2	Préparation des tampons et des échantillons.....	66
5.2.3	Électrophorèse capillaire.....	67
5.3	Résultats et discussion.....	68
5.4	Conclusion.....	80
6.	Conclusion générale	82
6.1	Conclusion.....	83
6.2	Directions futures	86

7. Références	88
----------------------------	-----------

Liste des tableaux

Table 2.1 Summary of different methods used for the derivative spectrum calculation and data smoothing to obtain λ_{\max}	21
Table 2.2 Comparison of MEKC and absorption spectroscopy for the estimation of peptide-micelle equilibrium association constants, K_{as}	23
Table 2.3 Summary of different methods used for the derivative spectrum calculation and data smoothing to obtain λ_{\max} of free Leu-Phe using $n = 12$	33
Table 2.4 Comparison of MEKC and absorption spectroscopy for the estimation of peptide-micelle equilibrium association constants, K_{as}	33
Tableau 3.1 Comparaison des paramètres de micellisation (CMC) et d'agrégation (CAC) du SDS dans des tampons phosphate pH 7,0 de différentes concentrations.....	48
Tableau 3.2 CAC, CMC et concentration c_2 du SDS et du CTAB dans des tampons phosphates ayant $I \approx 100$ mM.....	49
Tableau 4.1 Comparaison des constantes d'association apparentes entre la Met-enképhaline et des surfactants obtenues à partir des spectres différentiels de Tyr ou de Phe	59
Tableau 5.1 Détermination du pH auquel la mobilité d'une série de peptides subit un déplacement en présence de 0,2 g/L de PAMPS 90% Dod 10% par rapport à la mobilité électrophorétique	69
Tableau 5.2 Mobilités des espèces associées des différents systèmes copolymère-peptide estimées par régression non-linéaire ¹	78
Tableau 5.3 Constantes d'association apparente peptide-copolymère déterminées à partir du modèle utilisant les interactions 1:1 et 1:2 simultanément ²	79

Liste des figures

Figure 1.1 Équilibre entre un analyte (A) ayant deux sites de liaison et un agent micellant (C) ayant un site de liaison. 6

Figure 2.1 Double-reciprocal plot and weighted linear regression for the estimation of K_{as} by absorption spectroscopy for Met-enkephalin association with CTAB micelles. The concentration of CTAB in the micelles (complexing agent) was calculated as follows: $[C] = [CTAB]_{total} - 0.8 \text{ mM}$. The CTAB concentration ranged from 10 to 50 mM in sodium phosphate background electrolyte with total buffer ionic strength of 110 mM, pH 4.1, at 25°C. Analyte (YGGFM) concentration was 0.2 mM. The value of λ_{max} (i.e., λ_{obs}) was approximately 275 nm. Error bars represent the standard deviation of 3 replicate measurements. The correlation coefficient of the regression was $R^2 = 0.998$ and $K_{as} = 213 \pm 9 \text{ M}^{-1}$ 24

Figure 2.2 Double-reciprocal plot and weighted linear regression for the estimation of K_{as} by MEKC for Met-enkephalin association with CTAB micelles. The concentration of micellar CTAB and the background electrolyte were the same as in Fig. 2.1. Separations were carried out at 500 V/cm, 76.5 μA , with detection at 235 nm. Analyte (Met-enkephalin) concentration was 0.3 mM. Error bars represent the standard deviation of 3 replicate electropherograms. The correlation coefficient of the regression was $R^2 = 0.999$ and $K_{as} = 122 \pm 3 \text{ M}^{-1}$ 25

Figure 2.3 Déplacement du λ_{max} de Leu-Phe à différentes concentrations de SDS dans le tampon phosphate 50 mM, pH 7..... 30

Figure 2.4 Effet de l'augmentation de la concentration de SDS sur l'électrophérogramme de Leu-Phe. Tampon : 50 mM phosphate, pH 7, 25 kV, 20°C 31

Figure 2.5 Importance du facteur de correction de la viscosité lors de la détermination de la valeur de K_{as} entre Met-enképhaline et le CTAB..... 32

Figure 2.6 Détermination de la constante d'association par MEKC à l'aide d'une régression non-linéaire basée sur l'équation 1.8. Tampon : 10 à 50 mM CTAB dans un tampon phosphate I=110 mM, pH 4,1, détection à 235 nm, analyte : 1 mM Met-enképhaline. 32

Figure 2.7 Double-reciprocal plot and weighted linear regression (error bars to determine weight) for the estimation of K_{as} by absorption spectroscopy for Met-enkephalin association with CTAB micelles. The concentration of CTAB in the micelles (binding agent) was calculated as follows: $[C] = [CTAB]_{total} - 0.8 \text{ mM}$. The CTAB concentration ranged from 10 to 50 mM in sodium phosphate background electrolyte with total buffer ionic strength of 110 mM, pH 4.1, at 25°C. Analyte (Met-enkephalin) concentration was 0.2 mM. The value of λ_{max} (i.e., λ_{obs}) was approximately 275 nm. Error bars represent the standard deviation

of 3 replicate measurements. The correlation coefficient of the regression was $R^2 = 0.998$, $F = 706$ (critical value is: $F_{1,3} = 216$ ($P = 0.05$)) and $K_{as} = 213 \pm 9 \text{ M}^{-1}$. .. 34

Figure 2.8 Double-reciprocal plot and weighted linear regression for the estimation of K_{as} by MEKC for Met-enkephalin association with CTAB micelles. The concentration of micellar CTAB and the background electrolyte were the same as in Fig. 2.1. Separations were carried out at 500 V/cm, 76.5 μA , with detection at 235 nm. Analyte (Met-enkephalin) concentration was 0.3 mM. Error bars represent the standard deviation of 3 replicate electropherograms. The correlation coefficient of the regression was $R^2 = 0.999$, $F = 2689$ (critical value is: $F_{1,3} = 216$ ($P = 0.05$)) and $K_{as} = 122 \pm 3 \text{ M}^{-1}$ 35

Figure 3.1 Influence du temps sur la mobilité (μ_{eff}) de la Met-enképhaline dans un tampon phosphate I = 106 mM, pH 8,1 contenant : (a) 0 mM SDS ($F = 43$, $R^2 = 0,7669$), (b) 50 mM SDS ($F = 177$, $R^2 = 0,9365$). 44

Figure 3.2 Progression dans le temps : (a) de la mobilité de la Met-enképhaline et ($F = 2,7$, $R^2 = 0,7703$) (b) du courant dans le capillaire ($F = 44$, $R^2 = 0,2143$), pour un tampon phosphate I = 94 mM, pH 7,0 contenant 50 mM de SDS. 45

Figure 3.3 Variation de la mobilité effective de la Met-enképhaline en fonction de la concentration de SDS. Tampon phosphate I = 106mM, pH 8,1. 47

Figure 3.4 Variation du facteur de correction de la viscosité, v , causée par l'augmentation de la concentration de SDS dans un tampon phosphate ayant un pH de 8,1 et une force ionique de 106 mM. 50

Figure 4.1 Spectres d'absorption (a) d'ordre zéro, (b) de première dérivée et (c) de troisième dérivée de la Met-enképhaline (—), de Leu-Phe (---) et de Ac-Tyr-NH₂ (...) dans un tampon phosphate I=106 mM, pH 8,1. 57

Figure 5.1 Structure des copolymères de AMPS, Dod et py ayant respectivement une abondance de $x = 80$ ou $90 \text{ mol } \%$, $y = 5, 10$ ou $15 \text{ mol } \%$ et $z = 0$ ou $5 \text{ mol } \%$ [80]..... 65

Figure 5.2 Effet de l'augmentation de la concentration (0 à 0,56 g/L de haut en bas respectivement) de PAMPS 90% Dod 5% py 5% (a) et de PAMPS 80% Dod 15% py 5% (b) sur le temps de migration de Leu-Phe et de la Leu-enképhaline (premier et deuxième pic respectivement). Tampon : I = 110 mM phosphate, pH 2,0, 11 kV, 25°C..... 71

Figure 5.3 Variation de la mobilité effective de la Leu-enképhaline avec la concentration de PAMPS 90% Dod 5% py 5% dans les conditions : tampon phosphate I = 110 mM, pH 2,0, 11 kV, 25°C. Les erreurs sont de la même taille que les points de donnée..... 74

Figure 5.4 Tracé de la fonction inverse pour le système PAMPS 90% Dod 5% py 5%-Leu-Phe. L'équation de la régression linéaire simple est : $y = -0,380 x + 600$. Le coefficient de corrélation de la droite est 0,9997 et $F = 195$ (la valeur critique est : $F_{1,4} = 225$ ($P = 0.05$)). 75

Figure 5.5 Régression non-linéaire pour le système Leu-enképhaline-PAMPS 90% Dod 5% py 5% dans les conditions : tampon phosphate $I = 110$ mM, pH 2,0, 11 kV, 25°C. Les points (■) apparaissant sur le graphique représentent les données expérimentales, tandis que la courbe représente la régression non-linéaire effectuée selon l'équation 5.2. Le coefficient de corrélation de la courbe est 0,99999 et $F = 18240$ (la valeur critique est : $F_{4,4} = 6,4$ ($P = 0.05$))...... 76

Liste des abréviations

ACE	affinity capillary electrophoresis (électrophorèse capillaire d'affinité)
Arg-Phe	arginine-phenylalanine
AMPS	monomère de 2-(acrylamido)-2-methylpropanesulfonate de sodium
ANOVA	Analyse de la variance
c_2	concentration à laquelle les micelles libres apparaissent
CAC	concentration d'agrégation critique
CE	capillary electrophoresis (électrophorèse capillaire)
CEC	capillary electrochromatography (électrochromatographie capillaire)
CMC	critical micellar concentration (concentration micellaire critique)
CTAB	cetyltrimethylammonium bromide (bromure de cétyltriméthylammonium)
CZE	capillary zone electrophoresis (électrophorèse capillaire en solution libre)
Dod	monomère de <i>N</i> -dodecyl-méthacrylamide
EKC	electrokinetic chromatography (chromatographie électrocinétique)
EOF	electroosmotic flow (flux électroosmotique)
FACCE	frontal analysis continuous capillary electrophoresis (analyse frontale continue en électrophorèse capillaire)
K_{as}	constante d'association apparente
LC	liquid chromatography (chromatographie liquide)
Leu-enképhaline	leucine enképhaline
Leu-Phe	leucine-phenylalanine
MEKC	micellar electrokinetic chromatography (électrophorèse capillaire en milieu micellaire)
Met-enképhaline	méthionine enképhaline
NMR	nuclear magnetic resonance (résonance magnétique nucléaire)
PAMPS	polymère de 2-(acrylamido)-2-methylpropanesulfonate de sodium

py	monomère de <i>N</i> -(1-pyrènylméthyl)méthacrylamide
SDS	sodium dodecyl sulfate (dodécyl sulfate de sodium)
Tyr-Phe	tyrosine-phenylalanine
UV	ultraviolet

Remerciements

En premier lieu, je souhaite remercier ma directrice de recherche, la Professeure Karen C. Waldron pour m'avoir accepté dans son groupe. J'ai grandement apprécié la confiance qu'elle m'a accordée, l'intérêt qu'elle a manifesté à la progression de mon projet et les précieux conseils qu'elle m'a prodigués et qui m'ont permis de réaliser ce dernier.

Je désire également remercier le Département de Chimie de l'Université de Montréal et la Professeure Joelle Pelletier qui m'ont permis d'utiliser leur spectrophotomètre UV/Vis. Je tiens aussi à remercier Roger C.W. Liu, Julie Murray et la Professeure Françoise Winnik qui m'ont gracieusement fourni les micelles polymériques nécessaires à la réalisation d'une partie de ce projet. Je tiens aussi à souligner les conseils judicieux que m'a donnés Alexandra Fürtös qui a effectué les études préliminaires de ce projet.

Mes remerciements s'adressent aussi à mes collègues de laboratoire avec qui il fût stimulant de travailler.

Je tiens finalement à remercier toute ma famille pour le soutien constant qu'elle m'a apporté.

1. Introduction générale

1.1 Importance de la détermination des constantes d'association

Les interactions moléculaires non-covalentes sont largement répandues dans la nature et leurs constantes d'association (K_{as}) sont des paramètres fondamentalement importants dans la compréhension d'un éventail de phénomènes biologiques et biochimiques. Par exemple, la détermination des K_{as} entre des protéines provenant du plasma et des médicaments est essentielle au développement pharmaceutique, puisque la concentration de médicaments non-liés à une excellente corrélation avec l'activité pharmacologique[1]*.

D'autre part, les micelles ont un attrait particulier, puisqu'elles permettent d'imiter la structure des membranes cellulaires. Cette caractéristique est largement utilisée pour étudier les interactions neuropeptides-membranes biologiques, ainsi que l'effet de ces interactions sur le changement de conformation des neuropeptides qui se produit avant son association avec son récepteur[2-4].

Les micelles sont aussi largement utilisées dans des techniques de séparation comme la chromatographie liquide et l'électrophorèse capillaire (CE). C'est en effet en 1984 que Terabe et al. ont introduit l'électrophorèse capillaire en milieu micellaire (MEKC)[5]. Cette technique a permis d'étendre le champ d'application de l'électrophorèse capillaire, puisqu'elle permet la séparation d'analytes non-ioniques grâce aux interactions entre l'analyte et les micelles, ce qu'il est impossible de faire en CE en solution libre (CZE). Cette méthode permet aussi d'améliorer l'analyse des composés ioniques, puisqu'il y a séparation selon leur degré d'hydrophobicité en plus de leur rapport charge/masse (seul mécanisme sur lequel repose la CZE). La détermination de K_{as} (aussi connue sous le nom de constante de partage) est essentielle dans cette branche de la chimie analytique, puisqu'elle permet de comprendre les mécanismes d'association analytes-micelles, facilitant ainsi le développement de méthodes de séparation en MEKC.

* Voir la section 7 pour les références

Ces dernières années, un vif intérêt s'est manifesté envers l'utilisation de polyelectrolytes comme phase pseudo-stationnaire en CE, afin de pallier aux faiblesses des surfactants conventionnels en MEKC[6-8]. Le grand éventail de structures chimiques que peut adopter les polymères permet théoriquement d'obtenir la sélectivité chromatographique désirée. Les polymères possèdent aussi une grande stabilité même si les conditions analytiques sont modifiées. Ils peuvent en effet, être solubles en présence ou en absence de solvants organiques. Afin d'obtenir un large éventail de migration des analytes, il est aussi possible de leur fournir une mobilité électrophorétique élevée. Les polymères doivent toutefois être monodisperses et avoir un transfert de masse rapide entre la phase pseudo-stationnaire et le tampon, afin d'obtenir des séparations efficaces.

Dans le domaine de la détermination de constantes d'association, Dubin et al. ont développé la technique FACCE (Frontal Analysis Continuous Capillary Electrophoresis) capable de quantifier les interactions entre des polyelectrolytes synthétiques et des protéines[9-16]. Cette technique ne s'applique toutefois qu'aux interactions ayant une cinétique très lente. D'autre part, Progent et al. ont développé une technique permettant de quantifier les constantes d'association entre des polyelectrolytes et des peptides ayant une cinétique rapide[17]. Finalement, Palmer et al. ont étudié la sélectivité de plusieurs copolymères formant des micelles unimoléculaires à l'aide d'une série d'analytes neutres[8, 18-21]. Il existe donc un grand vide dans la littérature au niveau de la détermination des K_{as} entre des peptides et des micelles polymériques, ainsi qu'au niveau de la compréhension de leur mécanisme d'association.

1.2 Calcul des constantes d'association

1.2.1 Électrophorèse capillaire

Le phénomène d'association entre un analyte et un agent micellant est bien connu en CE et a déjà été décrit en détail par le groupe de Chen[22-30]. L'interaction la plus simple et la plus commune rencontrée en CE entre un analyte A et un agent micellant C a une stœchiométrie 1 :1. L'association de deux molécules d'agent micellant avec un analyte peut se produire s'il y a plus

d'un site de liaison sur ce dernier. Toutefois, dans la plupart des cas par exemple dans celui des micelles de dodécyl sulfate de sodium (SDS) et de bromure de cétyltriméthylammonium (CTAB), des associations multiples se produisent rarement et elles ont donc une influence négligeable sur la mobilité de l'analyte. Un modèle décrivant des interactions 1 : 1 a d'abord été utilisé. Un équilibre dynamique 1 : 1 en CE peut donc être décrit selon :



où AC représente l'association entre l'analyte et l'agent micellant. Les équations qui suivent sont applicables que si la cinétique de la réaction 1.1 est rapide. En effet, l'équilibre doit se faire plus rapidement que la séparation afin de pouvoir estimer les constantes d'association de la façon décrites dans les équations suivantes[31]. Les systèmes peptides-agents micellants étudiés dans ce travail rencontrent cette condition, contrairement à d'autres systèmes ayant des cinétiques lentes et demandant ainsi l'utilisation de méthode différente telle l'analyse frontale[32]. La constante d'association (K_{as}) est :

$$K_{as} = \frac{[AC]}{[A][C]} \quad (1.2)$$

Lorsque l'analyte est dans sa forme libre, il a une mobilité électrophorétique, μ_{A-aq} , et lorsque l'analyte est lié, il a une mobilité électrophorétique, μ_{A-C} . La mobilité électrophorétique apparente de l'analyte, μ_{eff} , est définie selon :

$$\mu_{eff} = f\mu_{A-aq} + (1-f)\mu_{A-C} \quad (1.3)$$

où f est la fraction d'analyte sous forme libre. Il faut noter que l'analyte ou l'agent micellant doit être chargé et qu'il n'y a pas de restriction sur le type de solvant qui est utilisé.

La mobilité effective est aussi définie selon :

$$\mu_{eff} = \mu_{app} - \mu_{éo} \quad (1.4)$$

où $\mu_{éo}$ est la mobilité électroosmotique (dépend, par exemple, des propriétés du tampon) et μ_{app} est la mobilité apparente de l'analyte à une concentration d'agent

micellant donnée. Cette équation est utilisée afin de déterminer la mobilité effective de l'analyte de façon expérimentale.

Si la fraction de l'analyte libre (f) est définie comme $[A]/[A]_0$, où $[A]_0$ est la concentration initiale d'analyte avant l'association, la substitution de $[A]_0$ par $([A]+[AC])$ donne :

$$f = \frac{[A]}{[A]+[AC]} = \frac{1}{1+K_{as}[C]} \quad (1.5)$$

En remplaçant f dans l'équation (1.4) par l'équation (1.5), la mobilité électrophorétique peut être décrite selon :

$$\mu_{eff}^* = \frac{1}{1+K_{as}[C]} \mu_{A-aq} + \frac{K_{as}[C]}{1+K_{as}[C]} \mu_{A-C} \quad (1.6)$$

L'équation (1.6) ne peut être utilisée directement, à moins qu'un facteur de correction de la viscosité du tampon soit pris en compte[22]. Un facteur de correction, v , a donc été utilisé (voir section 3.2.3) afin de normaliser les mobilités électrophorétiques expérimentales. Comme la mobilité électrophorétique apparente normalisée, μ_{eff}^* , est égale à $v\mu_{eff}$, l'équation (1.6) devient :

$$v\mu_{eff} = \frac{1}{1+K_{as}[C]} \mu_{A-aq} + \frac{K_{as}[C]}{1+K_{as}[C]} \mu_{A-C} \quad (1.7)$$

L'équation (1.7) peut être réarrangée pour donner :

$$(v\mu_{eff} - \mu_{A-aq}) = \frac{K_{as}[C]}{1+K_{as}[C]} (\mu_{A-C} - \mu_{A-aq}) \quad (1.8)$$

Cette équation est utilisée pour les régressions non-linéaires où $[C]$ est connue et μ_{eff} et μ_{A-aq} peuvent être mesurées. L'inverse de cette dernière donne une relation linéaire qui a été utilisée afin de mieux détecter la présence d'équilibre d'ordre supérieur[25, 27].

$$\frac{1}{v\mu_{eff} - \mu_{A-aq}} = \frac{1}{\mu_{A-C} - \mu_{A-aq}} \cdot \frac{1}{K_{as}[C]} + \frac{1}{\mu_{A-C} - \mu_{A-aq}} \quad (1.9)$$

Ce modèle décrit adéquatement les interactions entre les micelles cationiques ou anioniques et les peptides.

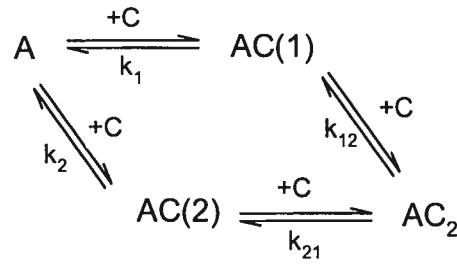


Figure 1.1 Équilibre entre un analyte (A) ayant deux sites de liaison et un agent micellant (C) ayant un site de liaison.

Dans le cas où des interactions analyte-agent micellant 1 :1 et 1 :2 seraient présentes simultanément (voir figure 1.1), les équations doivent être modifiées afin de refléter la présence d'équilibre d'ordre supérieur. Les nombres entre parenthèses dans la figure 1.1 représentent les sites de liaisons sur l'analyte qui interagissent avec l'agent micellant, et les constantes k_{ij} sont les constantes d'équilibre microscopiques, où i et j représentent les deux sites de liaisons différents. L'analyte peut donc être libre (A), lié à un agent micellant au site 1 (AC(1)), lié à un agent micellant au site 2 (AC(2)) ou doublement lié (AC₂(1,2)). Si la cinétique de la réaction est grande, la mobilité électrophorétique effective, μ_{eff} , est alors déterminée par la fraction de l'analyte de chacune des espèces (f) et par la mobilité électrophorétique de chacune de ces espèces ($\mu_{ép}$) :

$$v\mu_{eff} = f_A\mu_{A-aq} + f_{A-C(1)}\mu_{A-C(1)} + f_{A-C(2)}\mu_{A-C(2)} + f_{A-C_2(1,2)}\mu_{A-C_2(1,2)} \quad (1.10)$$

Les fractions de chaque espèce sont définies selon :

$$f_A = \frac{1}{1 + k_1[C] + k_2[C] + k_1k_{12}[C]^2} \quad (1.11)$$

$$f_{AC(1)} = \frac{k_1[C]}{1 + k_1[C] + k_2[C] + k_1k_{12}[C]^2} \quad (1.12)$$

$$f_{AC(2)} = \frac{k_2[C]}{1 + k_1[C] + k_2[C] + k_1k_{12}[C]^2} \quad (1.13)$$

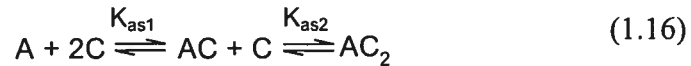
$$f_{AC_2(1,2)} = \frac{k_1k_{12}[C]^2}{1 + k_1[C] + k_2[C] + k_1k_{12}[C]^2} \quad (1.14)$$

$$= f_{AC_2(2,1)} = \frac{k_2 k_{21} [C]^2}{1 + k_1 [C] + k_2 [C] + k_1 k_{12} [C]^2}$$

L'insertion des fractions de chacune des espèces (équations 1.11-1.14) dans l'équation 1.10 donne :

$$\nu \mu_{eff} = \frac{\mu_{A-aq} + (k_1 \mu_{A-C(1)} + k_2 \mu_{A-C(2)}) [C] + k_1 k_{12} \mu_{A-C_2} [C]^2}{1 + (k_1 + k_2) [C] + k_1 k_2 [C]^2} \quad (1.15)$$

En général, les constantes d'équilibre observées sont la somme des constantes d'équilibre microscopiques provenant d'interaction de même ordre de grandeur. Il est donc impossible d'obtenir les constantes microscopiques individuelles lorsque l'effet de $[C]$ sur la mobilité de l'analyte est observé. Les constantes obtenues sont donc appelées constantes macroscopiques ou stœchiométriques, puisque toutes les interactions ayant la même stœchiométrie sont regroupées ensemble. L'équilibre présenté à la figure 1.1 peut être simplifié :



où les constantes d'équilibre macroscopiques (K_{as1} et K_{as2}) sont définies par :

$$K_{as1} = k_1 + k_2 = \frac{[AC(1)] + [AC(2)]}{[A][C]} = \frac{[AC]}{[A][C]} \quad (1.17)$$

$$K_{as2} = \frac{k_1 k_{12}}{k_1 + k_2} = \frac{k_2 k_{21}}{k_1 + k_2} = \frac{[AC_2(1,2)]}{([AC(1)] + [AC(2)])[C]} = \frac{[AC_2]}{[AC][C]} \quad (1.18)$$

Les constantes d'équilibre macroscopiques ne décrivent pas une interaction spécifique, mais la somme de chacune des interactions possibles entre l'analyte et l'agent micellant à une stœchiométrie particulière. AC a aussi une mobilité macroscopique :

$$\mu_{AC} = \frac{k_1 \mu_{A-C(1)} + k_2 \mu_{A-C(2)}}{k_1 + k_2} = \frac{[AC(1)] \mu_{A-C(1)} + [AC(2)] \mu_{A-C(2)}}{[AC(1)] + [AC(2)]} \quad (1.19)$$

La mobilité macroscopique de AC est une moyenne des mobilités microscopiques. En ce qui concerne AC_2 , les mobilités macroscopiques et microscopiques sont les mêmes, puisqu'il n'existe qu'une espèce ayant la stœchiométrie 1 :2.

Le remplacement, dans l'équation 1.15, des constantes microscopiques par les constantes macroscopiques donne :

$$\nu\mu_{eff} = \frac{\mu_{A-aq} + \mu_{A-C}K_{as1}[C] + \mu_{A-C_2}K_{as1}K_{as2}[C]^2}{1 + K_{as1}[C] + K_{as1}K_{as2}[C]^2} \quad (1.20)$$

qui peut être réarrangée selon :

$$(\nu\mu_{eff} - \mu_{A-aq}) = \frac{(\mu_{A-C} - \mu_{A-aq})K_{as1}[C] + (\mu_{A-C_2} - \mu_{A-aq})K_{as1}K_{as2}[C]^2}{1 + K_{as1}[C] + K_{as1}K_{as2}[C]^2} \quad (1.21)$$

Cette équation a été utilisée afin de décrire les interactions peptides-copolymères[28].

1.2.2 Spectrophotométrie d'absorption

Afin de comparer les constantes obtenues par CE, la spectrophotométrie d'absorption a été choisie. Le modèle d'association 1 :1 (voir équation 1.1) est aussi utilisé, puisque les systèmes peptides-micelles ont été étudiés dans des conditions similaires. L'équation générale de la constante d'association présentée à l'équation 1.2 est donc aussi utilisée en spectrophotométrie. Le paramètre expérimental qui subit un déplacement, lorsque la concentration d'agent micellant est augmentée, est la longueur d'onde au maximum d'absorbance provenant de la transition $\pi-\pi^*$ des cycles aromatiques présents dans le peptide. En effet, ces transitions sont sensibles à la polarité du milieu qui entoure le noyau aromatique. La position du maximum d'absorbance est donc décrite par[33] :

$$\lambda_{obs} = f\lambda_{A-aq} + (1-f)\lambda_{A-C} \quad (1.22)$$

où f est la fraction de l'analyte libre. Cette valeur est définie par :

$$f = \frac{[A]_{aq}}{[A]_{tot}} = \frac{[A]}{[A] + [AC]} \quad (1.23)$$

Après réarrangement et substitution du rapport $[AC]/[A]$ par la valeur tirée de l'équation 1.2, on trouve :

$$f = \frac{1}{1 + K_{as}[C]} \quad (1.24)$$

En combinant les équations 1.24 et 1.22 on obtient :

$$\lambda_{obs} = \frac{1}{1 + K_{as}[C]} \lambda_{A-aq} + \frac{K_{as}[C]}{1 + K_{as}[C]} \lambda_{A-C} \quad (1.25)$$

La fonction inverse est utilisée de façon analogue à celle utilisée dans l'étude faite par CE et elle se présente sous la forme :

$$\frac{1}{\lambda_{obs} - \lambda_{A-aq}} = \frac{1}{\lambda_{A-C} - \lambda_{A-aq}} \cdot \frac{1}{K_{as}[C]} + \frac{1}{\lambda_{A-C} - \lambda_{A-aq}} \quad (1.26)$$

Le graphique résultant de l'équation 1.26 est connu sous le nom de tracé Benesi-Hildebrand[34].

1.3 Objectifs du projet

Notre groupe de recherche s'intéresse depuis plusieurs années à la séparation de peptides par CE et par MEKC, dans le but de faire l'analyse de biofluides et de médicaments, ainsi que de la cartographie peptidique et de la simulation d'interaction récepteur-membrane. La MEKC possède la capacité de séparer des peptides de structures similaires, grâce à de subtiles différences au niveau des constantes d'association qui sont basées sur les différentes interactions hydrophobes et électrostatiques entre les peptides et l'agent micellant. Plusieurs méthodes analytiques incluant la MEKC ont été développées afin de déterminer les constantes d'association, K_{as} , entre des peptides et des micelles. Toutefois, la fiabilité de la MEKC dans ce type d'étude n'a jamais été investiguée en profondeur. Le chapitre 2 de ce mémoire compare donc la technique MEKC à la spectrophotométrie d'absorption pour la détermination des K_{as} d'une série de trois peptides en présence de micelles anioniques et cationiques. Nous tentons d'identifier les raisons pour lesquelles différentes valeurs de K_{as} décrivant exactement les mêmes systèmes chimiques, ont été obtenues à partir des deux techniques utilisées.

Au cours de la détermination des K_{as} par MEKC, nous avons obtenu des résultats étranges lorsque nous tentions de calculer la CMC du SDS. Le chapitre 3 décrit donc en détail comment l'évolution des solutions de SDS en fonction de leur âge et la variation de viscosité en fonction de la concentration en SDS affectent la mobilité des peptides et donc, la valeur des K_{as} . Dans le chapitre 4, un regard en profondeur de la détermination des K_{as} par spectrophotométrie

d'absorption est réalisé, afin d'expliquer les différences entre ces K_{as} et ceux obtenues par MEKC avec la Met-enképhaline. À l'aide de la 3^e dérivée du spectre UV/vis, nous étions capables de séparer la contribution de chacun des résidus aromatiques (phénylalanine et tyrosine) lors de l'association entre la Met-enképhaline et les micelles.

Les micelles formées de surfactants classiques sont un bon exemple d'agents qui peuvent être utilisés dans la séparation de peptides analogues. Récemment, plusieurs articles sont toutefois apparus sur l'interaction entre des micelles polymériques et des protéines et nous voulions voir si de tels composés pouvaient être utilisés afin de séparer des peptides par EKC. Le chapitre 5 décrit donc les efforts faits pour déterminer les K_{as} entre les copolymères formés de 2-(acrylamido)-2-méthylpropanesulfonate de sodium (AMPS), de *N*-dodecyl-méthacrylamide (Dod) et de *N*-(1-pyrènylméthyl)méthacrylamide (gracieuseté du Dr. F. Winnik, Pharmacie et Chimie, Université de Montréal) et de petits peptides par la même méthode analytique utilisée au chapitre 2.

2. A comparison between electrokinetic capillary chromatography and absorption spectroscopy for the analysis of peptide-micelle association by weak hydrophobic interactions^{1, 2}

Adapted from:

Carl Hémond, Alexandra Fürtös-Matei and Karen C. Waldron, *Electrophoresis*,
24, 816-823 (2003)

¹ Des données complémentaires sont données en annexe à la section 2.5

² Les références de ce chapitre se retrouvent à la section 7

Abstract

Capillary electrophoresis (CE) is one of many techniques that can be used to determine the equilibrium association/dissociation constants for interaction between peptides and micelles. Since the relative binding strengths of a series of peptides are normally sought after, the reliability of a given method to determine absolute association constants is rarely considered, particularly because experimental conditions vary widely. Nonetheless, it is important to know whether equilibrium association constants, K_{as} , obtained by CE-based methods are meaningful by comparing them to values obtained by another instrumental technique, keeping in mind that each method interrogates a different property and can thus bias the K_{as} estimation. In this study, micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC) was compared to absorption spectroscopy to estimate K_{as} for peptide-micelle systems involving three peptides (leucine-enkephalin, methionine-enkephalin and leucine-phenylalanine: Leu-Phe) and two surfactant micelles (SDS: sodium dodecylsulphate and CTAB: cetyltrimethylammonium bromide). Buffer pH was chosen to minimize purely electrostatic interactions between peptides and micelles that could not be interrogated by absorption spectroscopy and buffer ionic strength (~ 100 mM) was kept the same for both techniques. Viscosity-corrected MEKC mobilities gave reasonably similar estimates of K_{as} between the two methods for all three peptide-SDS micelle systems, with K_{as} values ranging from 12 ± 3 to $38,6 \pm 0,7 \text{ M}^{-1}$. For the CTAB, estimates of K_{as} for Leu-Phe-CTAB micelle association were of the same order of magnitude as the SDS micelle by the two methods of estimation. On the other hand, enkephalin-CTAB micelle binding was about 10 times stronger ($K_{as} = 122 \pm 3 \text{ M}^{-1}$ to $311 \pm 9 \text{ M}^{-1}$) than the enkephalin-SDS micelle binding. In addition, MEKC underestimated the K_{as} values relative to spectroscopy by a factor of 2 to 3 for the enkephalin-CTAB system.

2.1 Introduction

Numerous studies in the biosciences concern the interactions between micellar agents and biological molecules, in part because micelles can be used to mimic cell membranes [35, 36]¹. Many types of interactions (e.g., hydrophobic, electrostatic, hydrogen bonding, dipole induced, etc.) may be implicated during binding with micelles, which has led to the exploitation of several physico-chemical techniques aimed at understanding and quantifying these associations. The determination of equilibrium association constants, K_{as} , also termed binding constants [37], can be made by a variety of experimental approaches including chromatography [38, 39], NMR [40, 41], molecular spectroscopy [42, 43] and capillary electrophoresis [25, 32, 44]. A large portion of the literature on determining K_{as} deals with graphical and statistical approaches for correctly interpreting data and transforming the binding isotherm for convenient analysis. There is little information on how well these approaches compare to each other. However, if such estimations are to be of general use, discrepancy between values obtained by different techniques should be small and care should be taken to choose conditions that interrogate the same properties. At least, the binding trends determined by different techniques should be the same. Certainly, some approaches require the substrate to have specialised properties that change upon binding, like fluorescence intensity, which may not be strongly correlated with a chemical shift in NMR. The aim of the present work was to determine whether K_{as} for peptide-micelle associations estimated by capillary electrophoretic (CE) methods are reliable by comparing them to estimations obtained by absorption (UV-visible) spectroscopy under the same conditions.

The rapid, high resolution separations afforded by CE-based techniques have made them an attractive method for peptide analysis. When Terabe's group demonstrated micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC) in the mid-1980s [5, 45], it was expected to rival liquid chromatography (LC) for the

¹ Les références se trouvent à la section 7

analysis of amino acids and peptides. In reality, MEKC using charged micelles can be problematic for the separation of micelle mixtures of peptides [46, 47]; their zwitterionic nature leads to strong, yet non-specific, electrostatic interactions with charged micelles masking weaker hydrophobic effects that make reversed-phase LC selective. This underlines the importance of solution pH. If the interactions quantified by K_{as} are to be probed in parallel by absorption spectroscopy, the peptide (analyte) needs to contain an aromatic chromophore and solvent conditions need to favour the change in either energy or intensity of the π - π^* transitions of the chromophore upon association with the micelle.

Several reviews have appeared over the last decade on using CE-based methods to determine association constants [1, 32, 39] as well as papers describing the need for viscosity correction factors [22, 44]. In affinity CE methods, an obvious shift of electrophoretic mobility is observed as a function of binding agent (i.e., ligand) concentration. The double-reciprocal or other linear transformation of the binding isotherm is then plotted taking into account the variation in separation buffer viscosity upon addition of binding agent. A classical way to determine association constants using absorption spectroscopy is to monitor the change in molar absorptivity at a local absorbance maximum of the analyte as a function of the concentration of binding agent [34, 48, 49]. Essentially, the sensitivity of the π - π^* transition to the polarity of the surrounding environment is monitored. Similarly, a subtle wavelength shift in the absorbance maximum for analyte chromophores that interact with the ligand can be used. Woolley and Deber [35] proposed that a 1-nm bathochromic (red) shift in λ_{max} of the phenyl residue in the spectrum of substance P in the presence of SDS micelles resulted from the local environment of the aromatic groups having changed from hydrophilic to hydrophobic. On the other hand, the phenomenon of a detectable wavelength shift has not been observed for all peptide-micelle systems. It has been noted that interactions of peptide with SDS micelles are mostly electrostatic in nature with hydrogen-bonding possibly implicated, particularly for peptides of 7 residues or larger [38]. Nonetheless, when at least a slight shift in λ_{max} occurs as a result of peptide-micelle association, this parameter can be precisely measured

using derivative spectroscopy (1st or 3rd order, where a zero-crossing corresponds to a local absorbance maximum [50, 51]) compared to measuring an absorption shift that is sensitive to small volume changes and thus less precise.

Using the general model of the binding isotherm [1, 27, 32, 34, 44] and assuming 1:1 peptide-micelle association for small peptides [40, 43, 52], we examine here the differences between K_{as} obtained using spectrophotometric and electrophoretic data and identify the interactions that may explain the observed differences. The two surfactants used in this study are common additives for MEKC: SDS, which forms anionic micelles and thus mimics phospholipid membranes, and cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), which forms cationic micelles. The peptides included two small neuropeptides (Met-enkephalin and Leu-enkephalin) and a dipeptide (Leu-Phe), all chosen because of their apparent simplicity of interaction with micelles and the presence of an aromatic chromophore. To probe relatively weak hydrophobic interactions that would permit acquisition of spectral data to estimate K_{as} , buffer pH was carefully chosen for each micellar system.

2.2 Materials and methods

2.2.1 Materials

Leu-Phe (purity > 99 %) was purchased from Bachem (Torrance, CA, USA). Leu-enkephalin (purity: 98 %), Met-enkephalin (purity: 98 %), SDS (purity > 99 %) and CTAB (purity ~ 99 %) were obtained from Sigma-Aldrich Canada (Mississauga ON, Canada) and used without further purification. Monobasic and dibasic sodium phosphate were from Anachemia (Montreal, QC, Canada). Phosphoric acid was purchased from A&C Chemical (Montreal, QC, Canada). In-laboratory distilled water was passed through a four-cartridge Milli-Q water purification system (Millipore Canada, Nepean, ON, Canada) and used to prepare all buffer, sample and rinse solutions. Fused-silica (f.s.) capillary tubing was purchased from Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA). Nylon syringe

filters, 0.2- μm pore size, were bought from Chromatographic Specialties (Brockville, ON, Canada).

2.2.2 Buffer and sample preparation

Stock peptide solutions (1 mg/ml) were prepared in water and stored at -20°C . Analyte mixtures were diluted in buffer (background electrolyte) to give a final concentration for each peptide of approximately 0.6 mM for MEKC studies and 0.2 mM for absorption spectroscopy measurements. Peptides were identified in electropherograms by spiking the mixture. Spectroscopic measurements were made with individual peptides.

Background electrolyte buffers at pH 4.1, 7.0 and 8.1 were prepared by mixing monobasic and dibasic sodium phosphate solutions then titrated to the desired pH with a few microliters of phosphoric acid or sodium hydroxide to give an ionic strength close to 100 mM (e.g., pH 4.1, $I = 110$ mM: 110 mM NaH_2PO_4 , 24 μl H_3PO_4 ; pH 7.0, $I = 94$ mM: 19.5 mM NaH_2PO_4 , 30.4 mM Na_2HPO_4 ; pH 8.1, $I = 106$ mM: 1.8 mM NaH_2PO_4 , 36.1 mM Na_2HPO_4). Stock solutions of CTAB and SDS were prepared in water and added to the appropriate background electrolyte to give final concentrations ranging from 10 to 50 mM. Estimation of the critical micelle concentration (CMC) for each surfactant is described in section 3.2.2.

2.2.3 Absorption spectroscopy methods

Absorbance spectra were acquired on a Cary-100 Bio UV-Visible spectrophotometer (Varian Instruments, Mississauga, ON, Canada) in double beam mode. Scans were made from $\lambda_{\text{max}} - 10$ nm to $\lambda_{\text{max}} + 10$ nm (λ_{max} is 276 nm for enkephalins and 258 nm for Leu-Phe) at a scan rate of 15 nm/min.¹ To determine λ_{max} accurately, either the 1st or 3rd derivative of the acquired spectral data was used (standard deviation ranging from 0.01-0.05 nm was obtained on every single λ_{max} determined), both of which correspond to an abscissa intercept (zero-crossing) as a function of wavelength [50, 51]. The spectral data and

¹ Voir figure 2.3 pour un exemple graphique du déplacement du λ_{max} en fonction de [SDS]

particularly the derivative spectra were so noisy that multiple zero-crossings occurred in the region of λ_{\max} . Therefore, many data smoothing routines were investigated to improve the precision in the determination and Table 2.1 summarizes the best five of these. In the first scenario, 0th order spectra were exported to an Origin[®] spreadsheet (Microcal Software Inc., Northampton, MA, USA) and the 1st derivative with various smoothing routines of the spectrum was applied (first three rows of Table 2.1). In the second scenario, the Cary WinUV[®] software (Varian Instruments) was used to calculate and smooth the 1st or 3rd derivative spectra (last two rows of Table 2.1). Spectral noise was proportional to the order of derivatization, thus 1st derivative methods gave the best results. Adjacent averaging (13 points) of exported data using Origin either before or after calculating the 1st derivative led to the same precision. Regardless of the routine, data smoothing produced a small shift in λ_{\max} depending on the number of points used, as expected. However, because the relative change in λ_{\max} was used to estimate the association constant (see Eq. (2.1) below), this systematic shift cancelled out.

To estimate the peptide-micelle equilibrium association constants from shifts in λ_{\max} as a function of binding agent (micellar surfactant) concentration, the general 1:1 binding isotherm was linearly transformed into the following double-reciprocal form:

$$\frac{1}{\lambda_{\text{obs}} - \lambda_{A-\text{aq}}} = \frac{1}{\lambda_{A-C} - \lambda_{A-\text{aq}}} \cdot \frac{1}{K_{\text{as}}[C]} + \frac{1}{\lambda_{A-C} - \lambda_{A-\text{aq}}} \quad (2.1)$$

where $\lambda_{A-\text{aq}}$ is the wavelength of maximum absorption (λ_{\max}) of the analyte A (the peptide) in buffer in the absence of micelles, λ_{obs} is the observed λ_{\max} in buffer solutions of varying binding agent, C, concentration ($[C] = [\text{surfactant}] - \text{CMC}$, [44]) and λ_{A-C} is the true λ_{\max} of the analyte associated to micelles, whose value does not need to be known. A plot of $1/(\lambda_{\text{obs}} - \lambda_{A-\text{aq}})$ versus $1/[C]$ yielded K_{as} as the y-intercept/slope, determined using a weighted linear regression (values represented by errors bars were used as weight). Spectra were recorded on three portions of the same solution for each surfactant concentration studied and the

mean $1/(\lambda_{obs} - \lambda_{A-aq})$ value was plotted with error bars representing the standard deviation of the three measurements.

2.2.4 Capillary electrophoresis methods

Electrophoretic experiments were performed using a Beckman Coulter P/ACE MDQ CE system (Fullerton, CA, USA). Electropherograms were monitored at $\lambda = 200$ nm for SDS experiments and 235 nm for CTAB. Separations were carried out in a 50 μ m ID f.s. capillary having a 40.1 cm effective length and 50.1 cm total length. Samples were injected by applying a pressure of 0.3 psi (2 kPa) for 5 s. The applied separation voltage was 25 kV (either positive or negative, depending on the surfactant used). The measured current (absolute value) ranged from 75.6 to 76.2 μ A, in the absence of surfactant, for all three buffer pHs studied. The CMC for SDS and CTAB at each pH were determined by plotting the electrophoretic current as a function of surfactant concentration and extrapolating the linear regions below and above the CMC to their intersection. Results were as follows: for SDS in pH 7.0 buffer at 20°C, CMC = 3.3 mM; for SDS in pH 8.1 buffer at 33°C¹, CMC = 4.5 mM; for CTAB in pH 4.1 buffer at 25°C, CMC = 0.8 mM. The micellar aggregation number was not used to calculate the literal concentration of micelles as described in previous reports [38, 53] because the relative, not quantitative, values of K_{as} were desired. The CMC and micelle structures were assumed unchanged upon association with the peptides, as shown for similar studies [38, 40].

Before daily use, the capillary was flushed with 0.1 M NaOH for 10 min followed by water for 5 min and buffer for 10 min. Before each run, the capillary was preconditioned for 1.5 min with 0.1 M NaOH and subsequently with the running buffer for 5 min. The only exception was the rinsing procedure for CTAB experiments, made as follows: 0.1 M NaOH for 1 min, water for 1 min, 0.1 M H₂SO₄ for 2 min and then running buffer for 5 min. Buffer solutions were passed through a syringe filter just before use in the CE instrument. Dimethyl sulfoxide

¹ Voir le tableau 3.1 pour les valeurs de CMC révisées

(0.2 % v/v) or acetone (3 % v/v) was added to the samples to serve as the electroosmotic flow (EOF) marker.

For each surfactant concentration studied, electropherograms were run in triplicate¹. The apparent mobility was calculated by the 32 Karat® software (Beckman Coulter) using the actual capillary length and the average value of the applied voltage from the beginning of the run to the migration time (i.e., the voltage is ramped to 25 kV during the first 12 s of the run then held constant). Apparent mobilities were converted to effective mobility by subtracting the mobility of the EOF marker. To estimate peptide-micelle K_{as} from the mobility shifts as a function of micellar surfactant concentration, the following transformation, analogous to Eq. 2.1 was used:

$$\frac{1}{v\mu_{eff} - \mu_{A-aq}} = \frac{1}{\mu_{A-C} - \mu_{A-aq}} \cdot \frac{1}{K_{as}[C]} + \frac{1}{\mu_{A-C} - \mu_{A-aq}} \quad (2.2)$$

where v is the viscosity correction factor [22] (values of v were from 1.019 to 1.078 for increasing concentrations of SDS with relative errors ranging from 0.2-0.6 %, for CTAB solutions, values of v ranged from 1.013-1.096 with relative errors ranging from 0.2-0.4 %), μ_{A-aq} is the effective mobility of the peptide in buffer in the absence of micelles, μ_{eff} is the observed effective mobility in buffer solutions of varying surfactant concentration, μ_{A-C} is the true effective mobility of the peptide associated to micelles, whose value does not need to be known, and C is the binding agent (surfactant concentration in the micelles). Error on the left hand side of Eq. 2.2 was calculated according to the propagation of error approach. In the case of K_{as} , the error was calculated based on the propagation of the errors on the slope and Y-intercept obtained from the linear regression.

The viscosity correction factor was calculated as follows. A plug of analyte was injected at the capillary inlet and a constant pressure applied. The CE system used in this study had a lag period of 0.15 min between the signal to apply a pressure and the moment when 1 psi (7 kPa) was fully reached. This time lag was subtracted from the measured analyte elution time [23]. The viscosity

¹ Voir la figure 2.4 pour un exemple graphique du déplacement du temps de migration en fonction de la [SDS]

correction factor was then obtained by dividing the elution time of analyte at a given surfactant concentration by the elution time obtained in buffer without surfactant. A weighted (weight assigned by Origin® 6.0 based on the error calculated for each surfactant concentration, $[C]$, ran in triplicate) linear regression was used to calculate K_{as} from the intercept and slope of a plot of $1/(\nu\mu_{eff} - \mu_{A-aq})$ versus $1/[C]$, analogous to the case for absorption spectroscopy.

Temperature was carefully thermostated in the two analytical techniques. It was assumed that association constants could only be compared if the solution temperatures inside the capillary and cuvet were identical for the two methods. However, association constants estimated by MEKC increased by less than 20% in going from 30 to 15°C. Therefore, it was deemed unnecessary to determine the internal capillary temperature and record spectroscopy data at that value.

2.3 Results and discussion

As stated in the introduction, it is important to know whether one analytical method biases K_{as} relative to another (e.g., MEKC versus absorption spectroscopy) for a given peptide-micelle association. In addition, it is important that the data acquisition and treatment do not prejudice K_{as} estimates. The wavelength shift of the absorption maximum due to peptide-micelle association was typically less than 1 nm so the position of λ_{max} as a function of micellar surfactant concentration had to be determined as precisely as possible. From the results in Table 2.1, we decided that 13-point adjacent averaging of the 1st derivative absorbance spectrum was one of the best method to obtain λ_{max} of the free peptide and peptide associated to micelles. An example of the double-reciprocal transformation of the binding isotherm, given by Eq. 2.1, was plotted for Met-enkephalin-CTAB micelle association (Fig. 2.1). The weighted linear regression gave an estimate of $K_{as} = 213 \pm 9 \text{ M}^{-1}$. Data treatment by a non-linear fit to the binding isotherm using Eq. 1.7 or 1.25, gave K_{as} values in good agreement with the double-reciprocal method (data not shown), but the standard deviation on K_{as} was slightly higher, particularly in the case of the enkephalin peptides versus the dipeptide. This could be explained by the fact that too much

importance is given to data points that have high standard deviations, unlike the case of weighted linear regression.¹

Analogously, Fig. 2.2 shows the double-reciprocal plot of MEKC mobility data as a function of CTAB concentration in the micelles, given by Eq. (2.2), used to estimate K_{as} . Even though effective mobilities were plotted, the increasing buffer viscosity with surfactant concentration was confirmed to be an important variable in Eq. (2.2). For example, without using the viscosity correction factor, K_{as} was overestimated by a factor of 1.3 (same absolute error).

Table 2.1 Summary of different methods used for the derivative spectrum calculation and data smoothing to obtain λ_{max} ²

Software	Parameters	λ_{max} (nm)	s_{λ} (nm) ^a
Microcal	<i>1st derivative</i> , adjacent averaging of 13 pts	257.916	0.011
Origin v. 6.0	<i>1st derivative</i> , Savitzky-Golay (2 nd order polynomial; 6 points to left and right)	257.901	0.016
	<i>1st derivative</i> , Differentiate/Smooth (2 nd order polynomial; 6 points to left and right)	257.910	0.013
Cary WinUV	<i>1st derivative</i> , Savitzky-Golay (Filter Size = 13; Interval = 0.1 nm)	257.898	0.017
	<i>3rd derivative</i> , Savitzky-Golay (Filter Size = 27; Interval = 0.1 nm)	257.862	0.024

^a Standard deviation of four measurements. Analyte is Leu-Phe, 0.2 mM.

Table 2.2 presents the equilibrium association constants for the three model peptides with the two surfactants as estimated using the MEKC and absorption spectroscopy techniques. F values calculated using variances of binding constant[54] are also presented. K_{as} values estimated by the two methods for SDS micelle binding were the same order of magnitude given the difference in physico chemical parameter measured by each method. Since the calculated values of F (table 2.2) in the two-tailed F-test (P=0.05) for the comparison of

¹ Voir figure 2.6 pour un exemple de régression non-linéaire

² Voir le tableau 2.3 à la section 2.5 pour la mise à jour du tableau 2.1

standard deviations are less than the critical value ($F_{2,2} = 39.00$), there is no significant differences between the variances of the two techniques[54]. Therefore, it is appropriate to proceed with a comparison of the values of K_{as} obtained for the two analytical techniques. The relatively low binding constants indicate that there was little or no inclusion of aromatic side chains into the hydrophobic core of the SDS micelle. This observation is in agreement with the hypothesis made by Hicks et al. [4] that the hydroxyl group on tyrosine (Tyr) may be repelled from the hydrophobic core of the negatively charged SDS. They showed by NMR that in 50 mM SDS, Met-enkephalin adopts a β -turn conformation that is stabilized by an intramolecular hydrophobic interaction of Tyr and phenylalanine (Phe), with little detectable insertion of either aromatic side chain into the hydrophobic core of the SDS micelles [3]. This conformation placed the N-terminal amine and all five carbonyl oxygens on an outer hydrophilic face and placed the amide protons on the inner hydrophobic face near the aromatic side chains. NMR diffusion coefficient studies of peptide-SDS micelle binding for Leu-enkephalin and its various composite peptides by Deaton et al. [40] also showed little or no association of Tyr-containing dipeptides with SDS micelles, supporting the observation of Hicks' group. Association of the enkephalin peptides with SDS micelles is thus primarily a result of hydrophilic and/or electrostatic interactions. In their study of peptide-micelle binding for slightly larger peptides, Lu and Lundahl[38] indicated that hydrogen bonding as well as hydrophobic and electrostatic interactions participate in the association. We previously observed behavior consistent with strong electrostatic interactions in MEKC studies of enkephalin analogs [47]. Binding to SDS micelles increased (observed as shifts in the absolute electrophoretic mobility) as pH decreased from 8.9 to 5.4 (pI = 5.4) because the protonated N-terminal amine interacted with the anionic micelle.

Interestingly, the enkephalin-SDS micelle K_{as} values estimated by the two techniques are very similar for different reasons. Hydrophilic interactions between enkephalin peptides and SDS micelles underlie the MEKC mobility shifts. On the other hand, a decrease in the π - π^* energies of the Tyr and Phe

aromatic side chains due to intramolecular stacking as a consequence of hydrophilic association with SDS micelles led to the shifts in λ_{\max} . The same trend in peptide-SDS micelle binding was thus seen between electrophoretic and spectroscopic estimates of K_{as} . Higher K_{as} values ($130 \pm 8 \text{ M}^{-1}$) than our, obtained at a more acidic pH (5.4) by Deaton *et al.*[40] for Leu-enkephalin-SDS system, seem to suggest a strong pH dependence of peptide association constants.

Table 2.2 Comparison of MEKC and absorption spectroscopy for the estimation of peptide-micelle equilibrium association constants, K_{as} ¹

Ligand ^a	Analyte	$K_{as} (\text{M}^{-1})$ by MEKC	$K_{as} (\text{M}^{-1})$ by Spectroscopy
SDS micelle	LF	49 ± 1	35 ± 5
	YGGFM	21.1 ± 0.8	13.7 ± 0.3
	YGGFL	31.4 ± 0.7	33 ± 3
CTAB micelle	LF	25.9 ± 0.8	15 ± 2
	YGGFM	122 ± 3	213 ± 9
	YGGFL	155 ± 7	311 ± 9

^a Background electrolyte conditions: 20°C, pH 7.0 for LF (Leu-Phe)-SDS micelle studies; 33°C, pH 8.1 for YGGFM (Met-enkephalin) and YGGFL (Leu-enkephalin)-SDS micelle studies; 25°C, pH 4.1 for all CTAB micelle studies.

From the MEKC estimate in Table 2.2, Leu-Phe appears to bind SDS micelles ($K_{as} = 38,6 \pm 0,7 \text{ M}^{-1}$) more strongly than the enkephalins. This is probably caused in part by the different temperature used, but it seems to be also caused by the pH dependence mentioned above, since pH 7.0 was used for Leu-Phe-SDS micelle studies versus pH 8.1 for the enkephalin studies, giving the latter less cationic character. On the other hand, K_{as} estimated spectroscopically for Leu-Phe-SDS micelle association demonstrated the same binding strength as Leu-enkephalin-SDS micelle and was 1.4 times lower than the MEKC estimate. This discrepancy might be explained as follows. The Leu side chain of Leu-Phe is

¹ Voir le tableau 2.4 à la section 2.5 pour la mise à jour du tableau 2.2

slightly more hydrophobic than Phe [55], and might preferentially interact with the hydrophobic core of the SDS micelle, aided by electrostatic attraction from the N-terminus to which it is attached. This type of association would lead to an electrophoretic mobility shift but not readily to a large wavelength shift since the environment around Phe was not significantly modified. This is a peptide sequence effect [38], supported by results from Deaton et al. [40] who estimated $K_{as} = 69 \pm 6 \text{ M}^{-1}$ for Phe-Leu-SDS micelle association, twice the value we obtained ($26 \pm 2 \text{ M}^{-1}$); the hydrophobic residue closest to the partially protonated N terminus is the most likely to interact with the hydrophobic micelle core.

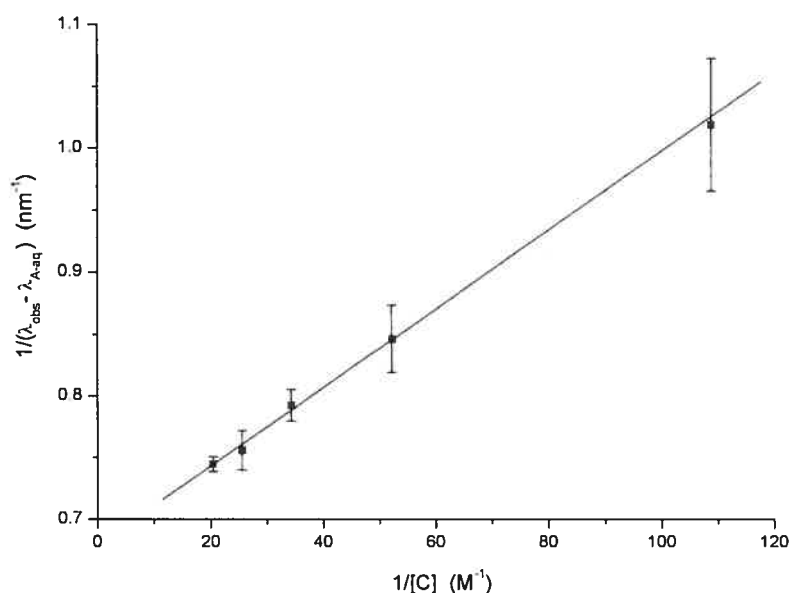


Figure 2.1 Double-reciprocal plot and weighted linear regression for the estimation of K_{as} by absorption spectroscopy for Met-enkephalin association with CTAB micelles. The concentration of CTAB in the micelles (complexing agent) was calculated as follows: $[C] = [\text{CTAB}]_{\text{total}} - 0.8 \text{ mM}$. The CTAB concentration ranged from 10 to 50 mM in sodium phosphate background electrolyte with total buffer ionic strength of 110 mM, pH 4.1, at 25°C. Analyte (YGGFM) concentration was 0.2 mM. The value of λ_{max} (i.e., λ_{obs}) was approximately 275 nm. Error bars represent the standard deviation of 3 replicate measurements. The correlation coefficient of the regression was $R^2 = 0.998$ and $K_{as} = 213 \pm 9 \text{ M}^{-1}$.¹

¹ Voir la figure 2.7 à la section 2.5 pour la mise à jour de la figure 2.1

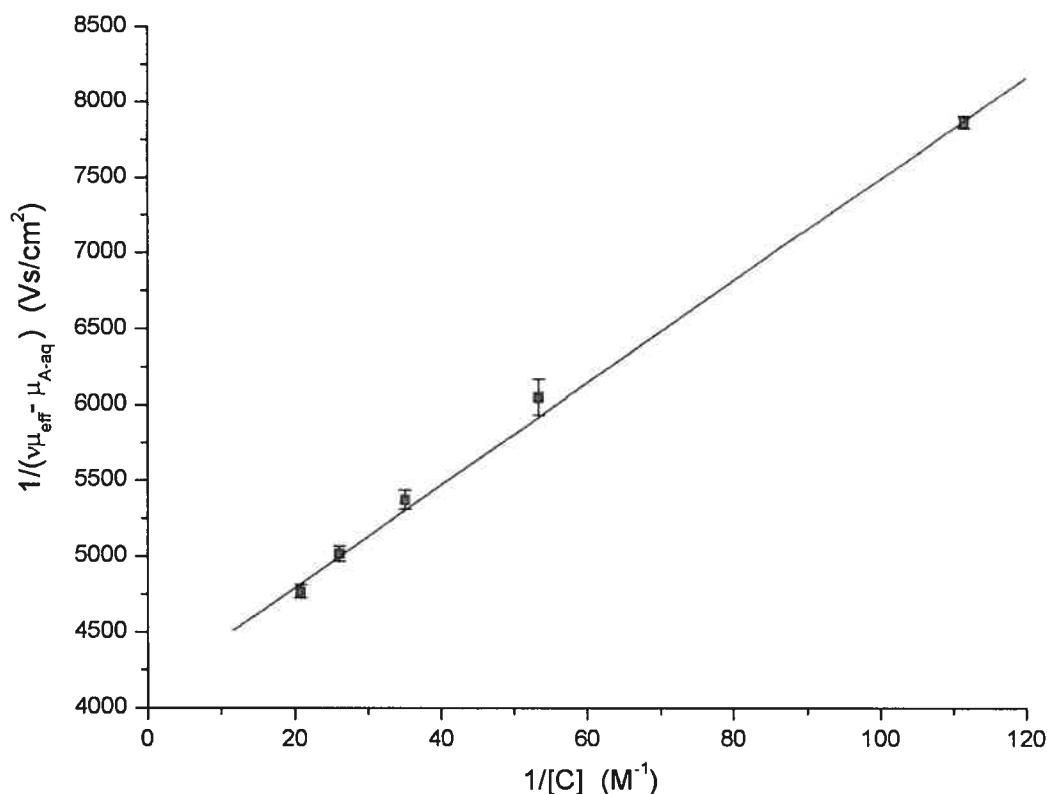


Figure 2.2 Double-reciprocal plot and weighted linear regression for the estimation of K_{as} by MEKC for Met-enkephalin association with CTAB micelles. The concentration of micellar CTAB and the background electrolyte were the same as in Fig. 2.1. Separations were carried out at 500 V/cm, 76.5 μA , with detection at 235 nm. Analyte (Met-enkephalin) concentration was 0.3 mM. Error bars represent the standard deviation of 3 replicate electropherograms. The correlation coefficient of the regression was $R^2 = 0.999$ and $K_{\text{as}} = 122 \pm 3 \text{ M}^{-1}$.¹

To induce strong associations between peptides and SDS micelles, Wooley and Deber [35] showed that positively charged amino acids such as arginine (Arg) and lysine (Lys) need to be present. We also observed this in a previous study; association constants for Lys-Phe-SDS micelles were 160 M^{-1} and 140 M^{-1} determined by MEKC and absorption spectroscopy, respectively, in pH 7.0 sodium phosphate buffer [33]. Error in these results was not determined. According to Young et al. [36], substrate-ligand collision triggered by

¹ Voir la figure 2.8 à la section 2.5 pour la mise à jour de la figure 2.2

electrostatic attraction in addition to random molecular motion is necessary to facilitate hydrophobic interactions. Ironically, our desire was to eliminate electrostatic interactions that would bias K_{as} estimates determined by absorption spectroscopy.

Lu and Lundahl [38] have stated that the surface structure and charge of micelles are important for the interaction with peptides, which may explain why the enkephalin peptide-CTAB micelle apparent association constants determined in our study (Table 2.2) show large differences between the two measurement techniques and also in comparison to SDS binding. For example, whereas Leu-Phe was more strongly associated with SDS micelles than the enkephalins by MEKC measurement, it was the weakest with CTAB micelles by a factor of five. On the other hand, Leu-Phe association with either SDS or CTAB micelles determined by MEKC or spectroscopy were similar, ranging from 15 to 39 M^{-1} . This suggests that a small hydrophobic peptide does not discriminate with respect to the surface or charge of the micelle. The opposite was observed for the enkephalins. By MEKC measurement, a five-fold stronger association of the two enkephalin peptides with CTAB versus SDS micelles was seen and, by spectroscopy, this difference was 9- and 15-fold for Leu-enkephalin and Met-enkephalin peptides, respectively.

In the case of the enkephalin-CTAB micelle systems, a 1-nm bathochromic (red) shift in λ_{max} centred around 275 nm was observed between 0 and 10 mM CTAB, corresponding to the tyrosine $\pi-\pi^*$ transition and thus a change of the chromophore to a more hydrophobic environment [35]. The higher K_{as} estimate observed for enkephalin-CTAB micelle binding versus SDS micelles imply that the former is a result of strong hydrophobic interactions as well as electrostatic and hydrophilic attractions at the micelle surface. At pH 4.1, the peptides and CTAB micelles are both net positively charged, although the enkephalin peptides still possess residual anionic character since more than 90% of the C-terminal carboxylate is deprotonated at pH 4.1 ($pI = 5.4$ for Met-enkephalin and Leu-enkephalin). This anionic character could provide enough initial electrostatic attraction between the enkephalin peptide and CTAB micelle

to facilitate inclusion of the aromatic side chain into the hydrophobic core of the micelle. Further experiments at a lower buffer pH would be necessary to confirm this. Induced-dipole interactions between the tyrosine OH group and CTAB surface may also contribute to the observed stronger association versus that with SDS micelles. The observed two-fold increase in enkephalin peptide-CTAB micelle affinity measured by absorbance spectroscopy versus MEKC is, however, more difficult to explain.

The dynamic nature of the MEKC experiments may impede electrostatically-induced collision [36] between the peptide and micelle, which in turn would hinder inclusion of the Tyr side chain into the hydrophobic core of the micelle. It is also possible that CTAB monomer-micelle equilibrium is strongly affected by the electric field, disrupting micelles to some extent during MEKC. Peptide-micelle association is independent of the method used to quantify it. Therefore, it is equally justified to question whether the absorbance spectroscopy method overestimated Leu-enkephalin-CTAB micelle association ($K_{as} = 311 \pm 9 \text{ M}^{-1}$). The large 1-nm wavelength shift for Leu-enkephalin absorption in going from no micelles (λ_{A-aq}) to the presence of CTAB micelles (λ_{obs}) might lead to higher K_{as} estimates if inclusion of the Tyr side chain in the micelle was short lived yet led to a strong signal during that brief period. It is hard to see how MEKC might underestimate the association constants for the two enkephalin peptides with CTAB micelles because any chemical or physical association should lead to an electrophoretic mobility shift, regardless of the nature of the association. It is possible that the surfactant concentrations studied should have been in the range of 1 to 20 mM given that $CMC_{CTAB} = 0.8 \text{ mM}$ under the experimental conditions. However, this modification would presumably affect MEKC estimates of K_{as} in more-or-less the same way. Studies on peptide-CTAB micelle associations using different concentration ranges and enkephalin peptide analogs as well as a study on the temperature dependence may help elucidate the discrepancies seen in Table 2.2. The possibility of Phe side chain inclusions in the micelle or at least a change in its environment upon association should also not be ruled out, although this would be difficult to monitor at

$\lambda = 258$ nm because the molar absorptivity of Phe is about half that of Tyr, thereby masking the Phe signal. At 275 nm, the molar absorptivity of Phe is 200 times less than for Tyr and it was confirmed by derivative spectroscopy that only Tyr contributed to the wavelength shift used to estimate K_{as} for the enkephalin peptides by Eq. (2.1).

2.4 Conclusions

There is no single technique for measuring peptide-micelle association constants that is the best. On the contrary, for the most reliable estimations, the working pH and peptide structure should ultimately dictate which technique might be the most appropriate. We found that MEKC led to more precise estimations of the association constants, K_{as} , than absorption spectroscopy because the latter suffered from background noise that was unfortunately amplified when taking the 1st derivative. Also, the variation in peptide mobility was more obvious than the shift in wavelength. For the small hydrophobic peptide Leu-Phe, association constants probing weak hydrophobic interactions with SDS micelles and CTAB micelles estimated by the two techniques compared well. For the slightly larger hydrophobic peptides Leu-enkephalin and Met-enkephalin, hydrophobic association with SDS micelles was estimated equally by the two methods. However, for the same two enkephalin peptides and their hydrophobic interactions with CTAB micelles, association constants estimated by absorption spectroscopy were approx. two times higher than those calculated by MEKC, questioning the utility of MEKC as a technique for the determination of peptide-micelle binding constants. Whether either or both of the techniques was biased is not clear. On other hand, both techniques estimated an order of magnitude stronger association of the enkephalin peptides with CTAB micelles compared to SDS micelles. There was evidence from spectroscopic data of a rather strong hydrophobic interaction with CTAB micelles, although micelle surface structure may have played a more important role than was intended, leading to electrostatic interactions that we had wanted to avoid.

The major advantages of electrophoretic and chromatographic methods over spectroscopic methods (absorption and NMR) for determination of association constants are their higher tolerance of sample contaminants, provided these are well separated from the analyte peaks, and better precision.

Acknowledgments

Funding for this work was provided by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. The authors wish to thank the reviewers for helpful suggestions toward revising the manuscript.

2.5 Annexe

Les figures 2.3 et 2.4 montrent l'effet de l'augmentation de la concentration en surfactant sur le λ_{\max} d'un cycle aromatique présent dans un peptide (Leu-Phe) et sur la mobilité effective du même peptide en CE respectivement. Dans le premier cas, les électrons subissent une transition électronique π - π^* induite par le faisceau de lumière UV. Comme l'énergie de cette transition est dépendante du milieu où se trouve le cycle aromatique, le λ_{\max} d'un peptide passant du tampon à la phase pseudo-stationnaire va subir un déplacement. D'autre part, ce déplacement est dépendant de la concentration en surfactant, puisque son augmentation va accroître statistiquement le nombre de peptides inclus dans les micelles (voir éq. 1.22).

Dans le cas de la MEKC, le peptide va d'abord migrer selon sa $\mu_{\text{ép}}$ jusqu'à ce qu'il s'associe à une micelle, ce qui va changer sa mobilité. Il va alors migrer à une vitesse égale à celle des micelles pendant tout le temps où il va rester lié, pour ensuite retourner dans le tampon et reprendre sa mobilité originale (voir équation 1.3). Comme en spectrophotométrie, plus la concentration en surfactant est élevée, plus le peptide passera de temps lié à la phase pseudo-stationnaire. La mobilité effective augmente alors, comme le montre la figure 2.4. Le temps de migration du peptide en absence de SDS est utilisé pour

calculer μ_{A-aq} ($\mu_{A-aq} = \mu_{eff, 0 \text{ mM de surfactant}} - \mu_{éo}$), qui devient une constante utilisée dans la détermination de K_{as} .

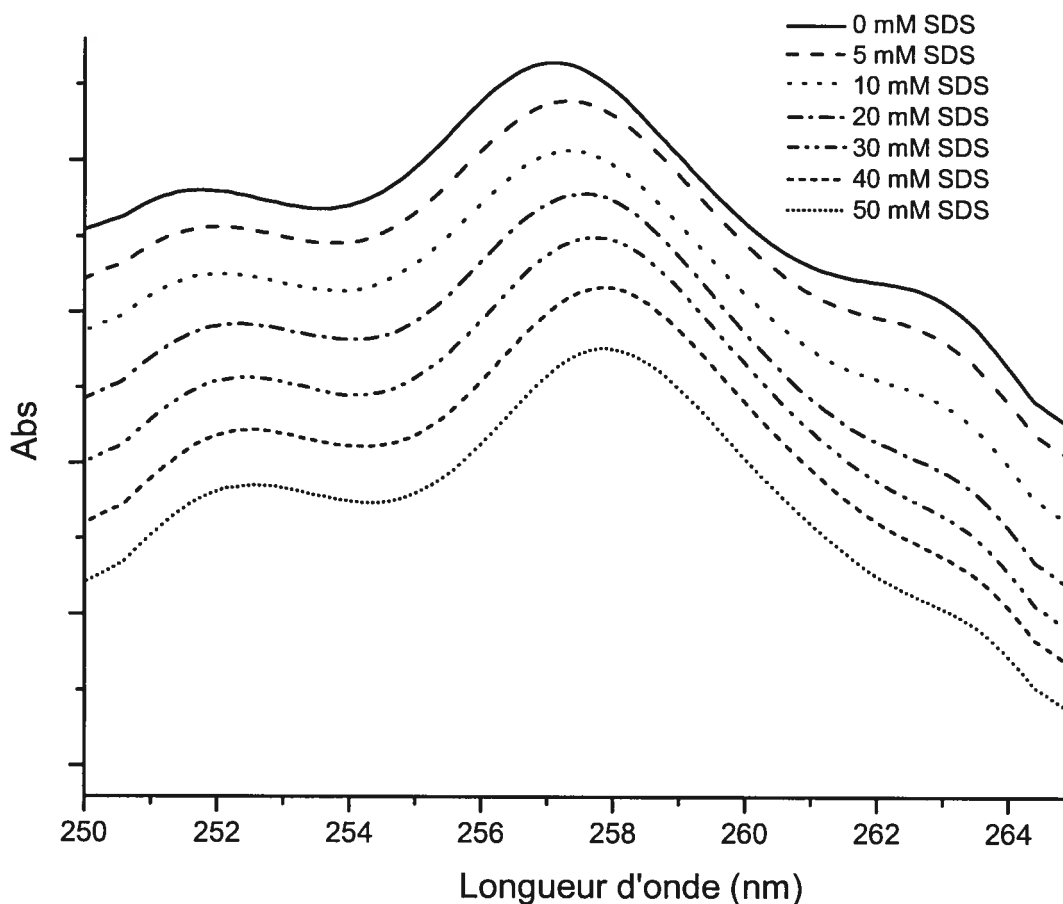


Figure 2.3 Déplacement du λ_{max} de Leu-Phe à différentes concentrations de SDS dans le tampon phosphate 50 mM, pH 7.

La figure 2.5 montre les données tracées avec et sans le facteur de correction de la viscosité. La comparaison entre les deux valeurs de K_{as} montre que cette dernière est surestimée, lorsque le facteur de correction n'est pas appliqué. Le facteur de correction a aussi un effet sur la précision des K_{as} , comme le montre la figure 2.5.

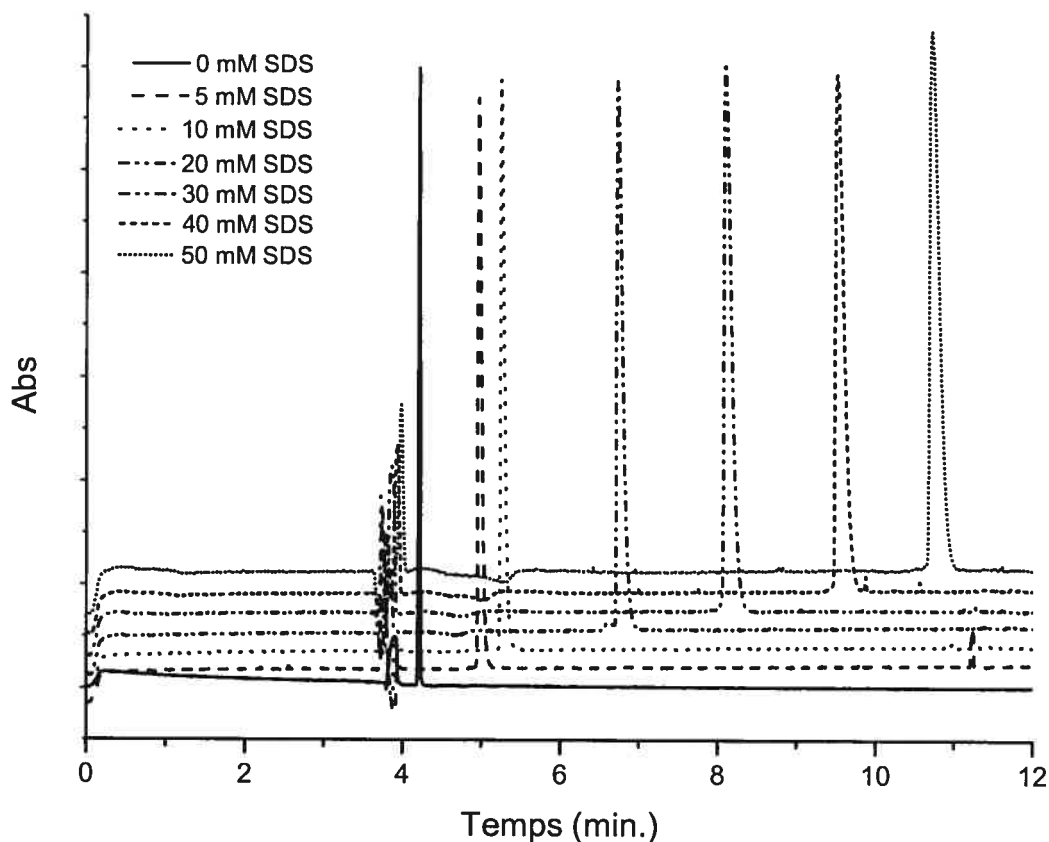


Figure 2.4 Effet de l'augmentation de la concentration de SDS sur l'électrophérogramme de Leu-Phe. Tampon : 50 mM phosphate, pH 7, 25 kV, 20°C

Comme il a déjà été mentionné à la section 2.3, les K_{as} obtenues par régression non-linéaire sont très similaires à celles obtenues avec la fonction inverse ($116 \pm 7 \text{ M}^{-1}$ et $122 \pm 3 \text{ M}^{-1}$ pour la régression non-linéaire et la fonction inverse respectivement). Toutefois, la constante obtenue par la fonction inverse est plus précise que celle obtenue par la régression non-linéaire. Dans le cas des deux méthodes, 18 mesures ont été utilisées afin de déterminer les K_{as} (l'acquisition de triplicata à 5 concentrations en surfactant différentes ont été effectuées en plus d'un triplicata en absence de surfactant).

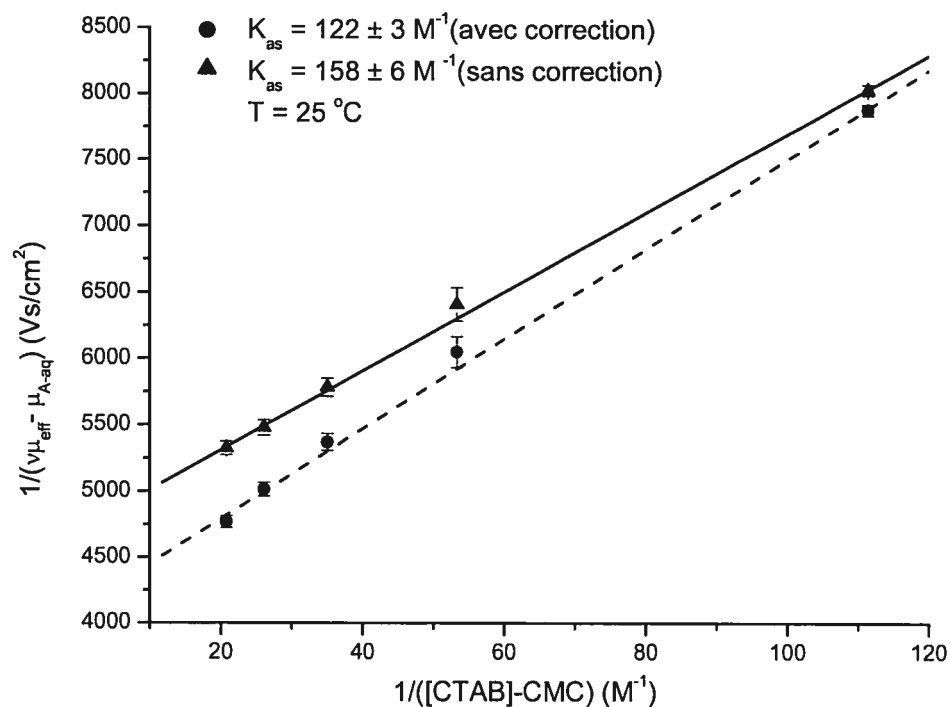


Figure 2.5 Importance du facteur de correction de la viscosité lors de la détermination de la valeur de K_{as} entre Met-enképhaline et le CTAB.

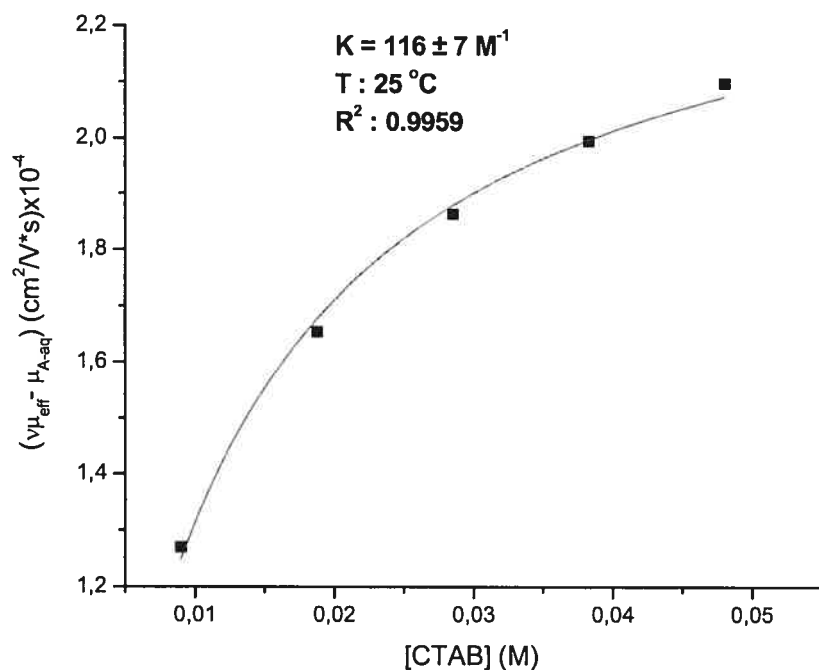


Figure 2.6 Détermination de la constante d'association par MEKC à l'aide d'une régression non-linéaire basée sur l'équation 1.8. Tampon : 10 à 50 mM CTAB dans un tampon phosphate I=110 mM, pH 4,1, détection à 235 nm, analyte : 1 mM Met-enképhaline.

Table 2.3 Summary of different methods used for the derivative spectrum calculation and data smoothing to obtain λ_{\max} of free Leu-Phe using $n = 12$

Software ^a	Parameters	λ_{\max} (nm)	s_{λ} (nm)
Microcal	1^{st} derivative, adjacent averaging of 13 pts	257.89	0.02
Origin v. 6.0	1^{st} derivative, Savitzky-Golay (2 nd order polynomial; 6 points to left and right)	257.89	0.02
	1^{st} derivative, Differentiate/Smooth (2 nd order polynomial; 6 points to left and right)	257.89	0.02
Cary WinUV	1^{st} derivative, Savitzky-Golay (Filter Size = 13; Interval = 0.1 nm)	257.88	0.07
	3^{rd} derivative, Savitzky-Golay (Filter Size = 27; Interval = 0.1 nm)	257.84	0.07

^a s_{λ} were determined with 3 scans done on 4 different solutions

Table 2.4 Comparison of MEKC and absorption spectroscopy for the estimation of peptide-micelle equilibrium association constants, K_{as} .

Binding Agent ^a	Analyte	K_{as} (M ⁻¹) by MEKC ^b n = 3	K_{as} (M ⁻¹) by Spectr. ^b n = 3	F ^c
SDS micelles	Leu-Phe	38,6 ± 0,7	26 ± 2	8,2
	Met-enkephalin	15,3 ± 0,7	12 ± 3	18,4
	Leu-enkephalin	24,1 ± 0,6	30 ± 3	25
CTAB micelles	Leu-Phe	25,9 ± 0,8	15 ± 2	6,3
	Met-enkephalin	122 ± 3	213 ± 9	9
	Leu-enkephalin	155 ± 7	311 ± 9	1,7

^a Background electrolyte conditions: 20°C, pH 7.0, I = 94 mM for Leu-Phe-SDS micelle studies; 33°C, pH 8.1, I = 106 mM for Met-enkephalin and Leu-enkephalin-SDS micelle studies; 25°C, pH 4.1, I = 110 mM for all CTAB micelle studies.

^b Mean values of K_{as} ± standard deviation are presented.

^c F-test values for the comparison of standard deviations (critical value is: $F_{2,2} = 39.00$ (for 2 degrees of freedom for both measurements, $P = 0.05$))

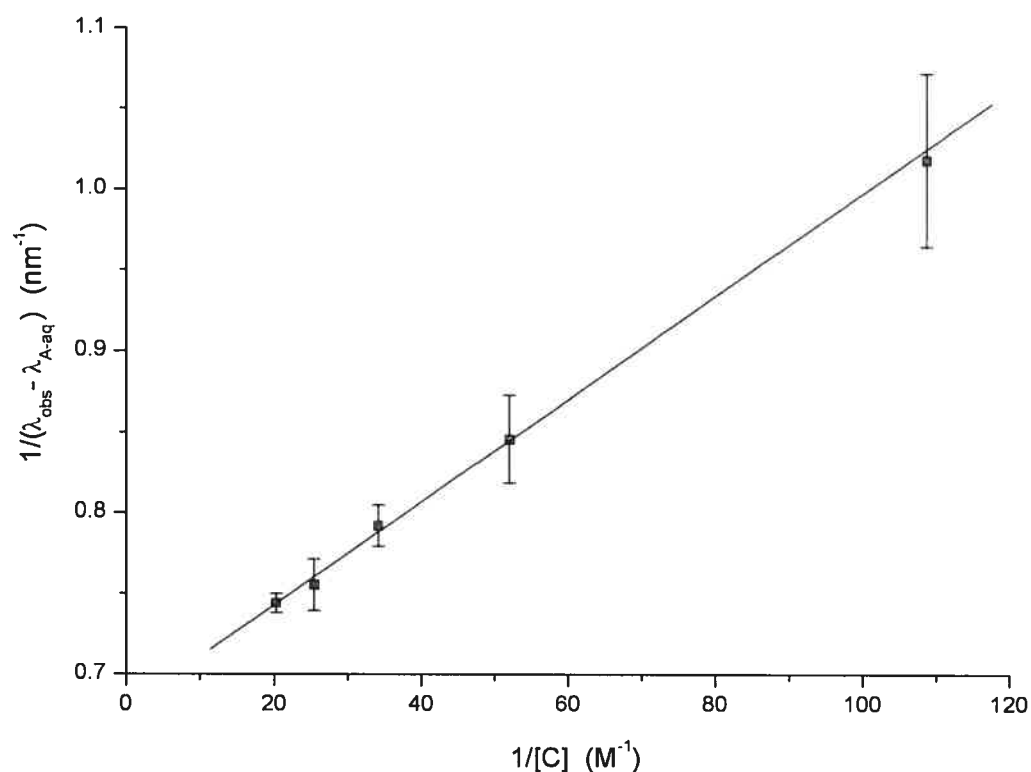


Figure 2.7 Double-reciprocal plot and weighted linear regression (error bars to determine weight) for the estimation of K_{as} by absorption spectroscopy for Met-enkephalin association with CTAB micelles. The concentration of CTAB in the micelles (binding agent) was calculated as follows: $[C] = [\text{CTAB}]_{\text{total}} - 0.8 \text{ mM}$. The CTAB concentration ranged from 10 to 50 mM in sodium phosphate background electrolyte with total buffer ionic strength of 110 mM, pH 4.1, at 25°C. Analyte (Met-enkephalin) concentration was 0.2 mM. The value of λ_{max} (i.e., λ_{obs}) was approximately 275 nm. Error bars represent the standard deviation of 3 replicate measurements. The correlation coefficient of the regression was $R^2 = 0.998$, $F = 706$ (critical value is: $F_{1,3} = 216$ ($P = 0.05$)) and $K_{\text{as}} = 213 \pm 9 \text{ M}^{-1}$.¹

¹ $F = \text{Mean Square regression/Mean Square Residual}$.

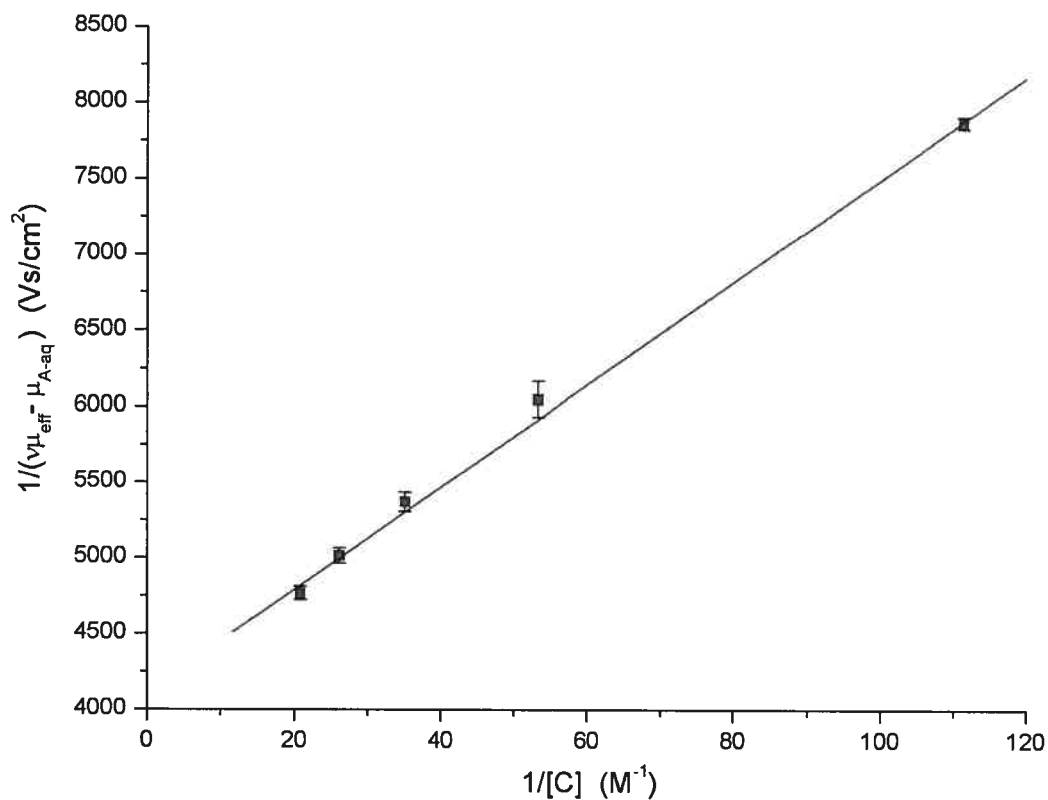


Figure 2.8 Double-reciprocal plot and weighted linear regression for the estimation of K_{as} by MEKC for Met-enkephalin association with CTAB micelles. The concentration of micellar CTAB and the background electrolyte were the same as in Fig. 2.1. Separations were carried out at 500 V/cm, 76.5 μA , with detection at 235 nm. Analyte (Met-enkephalin) concentration was 0.3 mM. Error bars represent the standard deviation of 3 replicate electropherograms. The correlation coefficient of the regression was $R^2 = 0.999$, $F = 2689$ (critical value is: $F_{1,3} = 216$ ($P = 0.05$)) and $K_{\text{as}} = 122 \pm 3 \text{ M}^{-1}$.

3. Comportement des solutions micellaires lors des études faites par électrophorèse capillaire

3.1 Introduction

Les micelles sont souvent utilisées comme modèle simulant les membranes cellulaires, permettant ainsi l'étude de leurs interactions avec des médicaments, des protéines ou toute autre substance d'intérêt biologique. Leur utilisation est donc très répandue, toutefois certains paramètres tels la dégradation des surfactants en fonction du temps et l'augmentation de la viscosité du tampon due à l'augmentation de la concentration, peuvent potentiellement affecter la qualité des résultats obtenus. Le SDS par exemple, s'hydrolyse en solution aqueuse[56, 57]. De plus, un facteur de correction de la viscosité a été développé par Chen et ses collègues[22-25, 27] afin de corriger les variations de la mobilité effective causées par l'augmentation de la concentration en surfactant.

La connaissance des paramètres de micellisation est d'une importance capitale lorsque des surfactants sont utilisés dans des études de K_{as} . À cet effet, Davies et al.[58] ont introduit au début des années 1930 le terme «concentration micellaire critique» (CMC). Ce terme est défini comme étant la concentration en dessous de laquelle les surfactants en solution sont sous forme monomérique et au-dessus de laquelle tous les surfactants additionnels qui sont ajoutés à la solution forment des micelles. Il existe toutefois d'autres paramètres de micellisation. En effet, il est bien connu que les surfactants interagissent avec un large éventail d'analytes lorsque la concentration en surfactant est plus grande qu'une concentration critique, habituellement appelée CAC (concentration d'agrégation critique). La valeur de la CAC se trouve à une concentration plus petite que la valeur correspondante de CMC d'une solution sans analyte. À la CAC, les molécules de surfactant s'associent à l'analyte, formant ainsi des agrégats de surfactant liés à l'analyte. Ces agrégats de surfactants ressemblent à des micelles libres. Toutefois, ces micelles ont un nombre d'agrégation (N_p) plus petit et une structure plus ouverte que les micelles libres. À des concentrations de surfactants plus grandes que la CAC, la grandeur de ces agrégats liés aux analytes augmente (N_p augmente). À une concentration en surfactant plus grande,

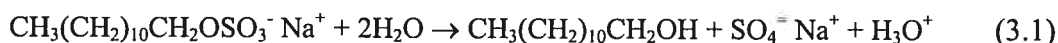
nommée c_2 , des micelles libres commencent à se former dans la solution qui comporte des agrégats de surfactant liés aux analytes[59-62].

Plusieurs méthodes utilisant la conductivité électrique, la tension de surface, la spectrophotométrie[63], la diffusion de la lumière, la voltamétrie cyclique, la vitesse de la lumière, la RMN et l'électrophorèse capillaire (CE)[59, 62, 64, 65] ont été développées pour déterminer la CMC de tels surfactants. Cette dernière méthode s'est révélée très intéressante étant donné la disponibilité de l'équipement[59, 62, 64, 65]. En effet, il a été démontré que la variation du courant électrique mesurée par l'appareil de CE ou la mobilité effective d'un analyte en fonction de la concentration en surfactant peuvent être utilisées pour déterminer la CMC. Dans les deux cas, un changement abrupt de pente peut être observé. Cependant, l'âge de la solution de surfactant affecte la CMC et le facteur de correction de la viscosité. Le comportement des solutions de SDS dans le temps a donc été étudié.

3.2 Théorie

3.2.1 Hydrolyse du SDS

L'hydrolyse du SDS pose un sérieux problème à la validité des constantes apparentes d'association et des CMC obtenues par électrophorèse capillaire, puisque l'acquisition des données nécessaires prend plusieurs heures de plus que l'étude faite par spectroscopie UV-Vis. Il est donc nécessaire de connaître les produits formés par cette réaction et surtout d'évaluer leur effet sur la mobilité effective des peptides utilisés. La réaction globale est la suivante[56] :



Selon la littérature, cette hydrolyse est considérée comme étant un déplacement $\text{S}_{\text{N}}2$ des ions sulfates par des molécules d'eau. Cette réaction dépend de la température, aussi l'hydrolyse d'une solution de SDS est complète après 24 heures seulement à 80°C[56]. L'étendue de l'hydrolyse n'a toutefois pas été évaluée à température ambiante dans cette étude.

3.2.2 Détermination de la CMC

À des concentrations prémicellaires et micellaires, la mobilité effective d'un peptide négativement chargé (A^-) peut être décrite mathématiquement selon[59] :

$$\mu_{eff} = \frac{\mu_{A^-} + K_{A^-S}[S]\mu_{A^-S}}{1 + K_{A^-S}[S]} \quad (\text{en dessous de la CMC}) \quad (3.2)$$

et

$$\mu_{eff} = \frac{\mu_{A^-} + K_{A^-S}(CMC)\mu_{A^-S} + K_{A^-M}[M]\mu_M}{1 + K_{A^-S}(CMC) + K_{A^-M}[M]} \quad (\text{au-dessus de la CMC}) \quad (3.3)$$

où μ_{A^-} est la mobilité électrophorétique du peptide chargé négativement, K_{A^-S} et μ_{A^-S} sont respectivement la constante d'association apparente et la mobilité électrophorétique du peptide associé aux monomères du surfactant, K_{A^-M} est la constante d'association apparente entre le peptide et les micelles, $[S]$ est la concentration en monomères de surfactant et $[M]$ est la concentration en micelles qui est définie comme la concentration totale en molécules de surfactant moins la valeur de CMC. Si les interactions sont faibles, le terme incluant K_{A^-S} est petit. Les équations 3.2 et 3.3 peuvent alors être simplifiées pour devenir[59] :

$$\mu_{eff} = \frac{1}{1 + K_{A^-S}[S]} \mu_{A^-} \quad (\text{en dessous de la CMC}) \quad (3.4)$$

ou plus simplement $\mu_{eff} = \mu_{A^-}$, si $K_{A^-S}[S] \ll 1$ et :

$$\mu_{eff} = \frac{\mu_{A^-} + K_{A^-M}[M]\mu_M}{1 + K_{A^-M}[M]} \quad (\text{au-dessus de la CMC}) \quad (3.5)$$

Des variations significatives de la mobilité électrophorétique des peptides sont observables seulement lorsque K_{A^-S} et K_{A^-M} sont élevées. Il faut noter que ces équations sont aussi valides pour des peptides chargés positivement interagissant avec des micelles cationiques.

3.2.3 Détermination du facteur de correction de la viscosité

La mobilité électrophorétique d'un analyte est inversement proportionnelle à la viscosité de la solution tampon, η , comme le démontre l'équation suivante[27] :

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (3.6)$$

où q est la charge intégrale de l'analyte et r son rayon hydrodynamique. En général, l'équation (3.6) ne peut pas être utilisée directement, à moins de tenir compte des autres facteurs influençant la valeur de μ_{eff} . Le plus important de ces facteurs est la viscosité du tampon. Le facteur de correction tenant compte de la viscosité est définie selon :

$$\nu = \eta/\eta^0 \quad (3.7)$$

où η est la viscosité du tampon à une concentration donnée en surfactant et η^0 est la viscosité du tampon, lorsque la concentration en surfactant tend vers zéro. L'utilisation de ce facteur de correction permet d'étudier l'association indépendamment du changement de viscosité qui peut affecter la mobilité électrophorétique.

Le facteur de correction peut être évalué en appliquant une pression constante à l'entrée du capillaire de séparation de CE et en comparant ensuite le temps requis pour pousser un analyte à chacune des concentrations en surfactant. En se basant sur l'équation de Poiseuille, ν est obtenu à partir de [27]:

$$\nu = \frac{\left(\frac{\Delta P t r^2}{8 L_c L_d} \right)}{\left(\frac{\Delta P t^0 r^2}{8 L_c L_d} \right)} = \frac{t}{t^0} \quad (3.8)$$

où ΔP est la pression appliquée pour pousser le fluide à travers le capillaire de rayon r , t et t^0 sont respectivement les temps nécessaires pour que l'analyte passe de l'entrée à la fenêtre de détection du capillaire en présence et en absence de surfactant, L_c est la longueur totale du capillaire et L_d est la distance entre l'entrée et la fenêtre de détection du capillaire. L'avantage de l'équation (3.8) est que le facteur de correction peut être obtenu à partir du capillaire utilisé lors de la séparation[27].

3.3 Matériels et méthodes

3.3.1 Provenance des produits

La Leu-Phe (pureté > 99 %) a été achetée de la compagnie Bachem (Torrance, CA, USA). La Leu-enképhaline (pureté : 98 %), la Met-enképhaline (pureté : 98 %), le SDS (pureté > 99 %) et le CTAB (pureté ~ 99 %) ont été obtenus de Sigma-Aldrich Canada (Mississauga, ON, Canada) et ont été utilisés directement sans aucune autre forme de purification. Le phosphate de sodium monobasique et dibasique ont été obtenus d'Anachemia (Montréal, QC, Canada). L'acide phosphorique a été acheté de A&C Chemical (Montréal, QC, Canada). L'eau distillée a été purifiée à l'aide d'un système Milli-Q (Millipore Canada, Nepean, ON, Canada) et a été utilisée dans la préparation de toutes les solutions tampons, de tous les échantillons et de toutes les solutions de rinçage. Les capillaires de silice fondue ont été achetés chez Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA). Les filtres de Nylon (pores de 0,2- μ m de diamètre) ont été achetés chez Chromatographic Specialties (Brockville, ON, Canada).

3.3.2 Préparation des tampons et des échantillons

Les solutions mères de peptides (1mg/ml) ont été préparées dans l'eau et entreposées à -20°C. Les mélanges d'analytes ont été dilués dans du tampon afin d'obtenir une concentration finale, pour chacun des peptides, d'environ 0,6 mM pour les études MEKC et d'environ 0,2 mM pour les mesures effectuées en spectroscopie d'absorption. Les mesures spectroscopiques ont été effectuées individuellement sur chacun des peptides.

Les solutions tampons ayant des pH de 4,1, 7,0 et 8,1 ont été préparées en mélangeant une quantité appropriée de phosphate de sodium monobasique et dibasique pour obtenir une force ionique d'environ 100 mM (pH 4,1, I = 110 mM: 110 mM NaH₂PO₄, 24 μ l H₃PO₄; pH 7,0, I = 94 mM: 19,5 mM NaH₂PO₄, 30,4 mM Na₂HPO₄; pH 8,1, I = 106 mM: 1,8 mM NaH₂PO₄, 36,1 mM Na₂HPO₄). Elles ont ensuite été titrées avec quelques microlitres d'acide phosphorique ou d'hydroxyde de sodium, afin d'obtenir le pH désiré. Les

solutions mères de CTAB et de SDS ont été préparées dans l'eau pour ensuite être ajoutées à une quantité appropriée de solution tampon, afin de donner des concentrations finales allant de 10 à 50 mM.

3.3.3 Électrophorèse capillaire

Toutes les expériences ont été effectuées à l'aide d'un appareil P/ACE MDQ de Beckman Coulter. L'acquisition des électrophérogrammes s'est faite à 200 nm dans le cas des expériences utilisant le SDS, et à 235 nm dans le cas du CTAB. Les séparations ont été effectuées dans un capillaire de 50 μ m de diamètre interne, de 40,1 cm de longueur entre l'entrée et la fenêtre de détection et de 50,1 cm de longueur totale. Les échantillons ont été injectés en appliquant une pression de 0,3 psi (2 kPa) pendant 5 s. Vingt-cinq kV (positif dans le cas du SDS et négatif dans le cas du CTAB) ont été utilisés comme potentiel de séparation. Une concentration constante de 50 mM de surfactant a été utilisée pour l'étude de stabilité. La détermination du facteur de correction de la viscosité a été effectuée dans les mêmes conditions, toutefois aucun voltage n'a été appliqué lors de l'étape de séparation. Une pression de 0,1 psi (0,7 kPa) a plutôt été utilisée pour que l'analyte élué à travers le capillaire. Pour étudier l'effet de l'âge de la solution de SDS sur la mobilité des peptides, le temps zéro a été défini comme étant le moment où le SDS solide a été dissout et une attente de 2 ou 2,5 heures a été ajoutée entre chaque séparation effectuée en triplicata afin de couvrir une période de temps plus longue. Une nouvelle solution tampon a été utilisée pour chacun des triplicatas effectués.

Au début de chaque journée, le capillaire a été rincé avec une solution de NaOH 0,1 M pendant 10 min, avec de l'eau pendant 5 min et avec la solution tampon appropriée pendant 5 min. Les expériences de CTAB ont toutefois fait exception. Dans ce cas, la procédure de rinçage a été effectuée comme suit : NaOH 0,1 M pendant 1 min, eau pendant 1 min, H₂SO₄ 0,1 M pendant 2 min et solution tampon pendant 5 min. Les solutions tampons ont été filtrées juste avant leur utilisation. Le diméthyl sulfoxyde (0,2 % v/v) ou l'acétone (3 % v/v) ont été ajoutés aux échantillons, afin de servir de marqueur de flux électroosmotique.

3.4 Résultats et discussion

Une légère augmentation de la mobilité effective est observée lorsqu'une série de séparations est effectuée dans un tampon sans surfactant ayant un pH de 8,1 et une force ionique de 106 mM, comme le montre la figure 3.1a (les mobilités présentées dans cette figure sont négatives, puisque le peptide est sous sa forme anionique). Cette variation est toutefois négligeable, puisqu'elle est de l'ordre de $1 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ après 12 heures (temps normalement requis pour préparer les solutions et faire l'acquisition des données nécessaires au calcul d'une constante d'association), soit 1 % de la valeur de la mobilité effective mesurée au début de l'expérience. Ce phénomène peut s'expliquer par le lent processus d'équilibration des silanols à la surface du capillaire à un pH donné ou par le tampon ayant un bas pH, ce qui a tendance à ronger le verre créant ainsi une certaine dérive de la mobilité effective.

Lorsque le tampon contient 50 mM de SDS, il se produit plutôt une diminution de la mobilité effective en fonction de l'âge de la solution (figure 3.1b). Dans ce cas, le phénomène a toutefois plus d'ampleur, puisque après 12 heures, la mobilité est réduite de 2 % ($5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$) par rapport à la valeur de mobilité effective obtenue au début de l'expérience. L'augmentation de la concentration du dodécanol, provenant de l'hydrolyse, modifie sûrement la nature des micelles (formation de micelles mixtes), les rendant ainsi plus hydrophobes. En effet, ce composé est insoluble dans l'eau et ne peut donc se retrouver qu'en phase micellaire. Cette modification semble augmenter la force des interactions des micelles avec les peptides, comme le montre la diminution de sa mobilité effective.

La stabilité du SDS à pH 7,0 a aussi été testée comme le montre la figure 3.2a. À prime abord, ces données semblent prendre une tendance différente de celles obtenues à pH 8,1. En fait, les points faisant partie du premier

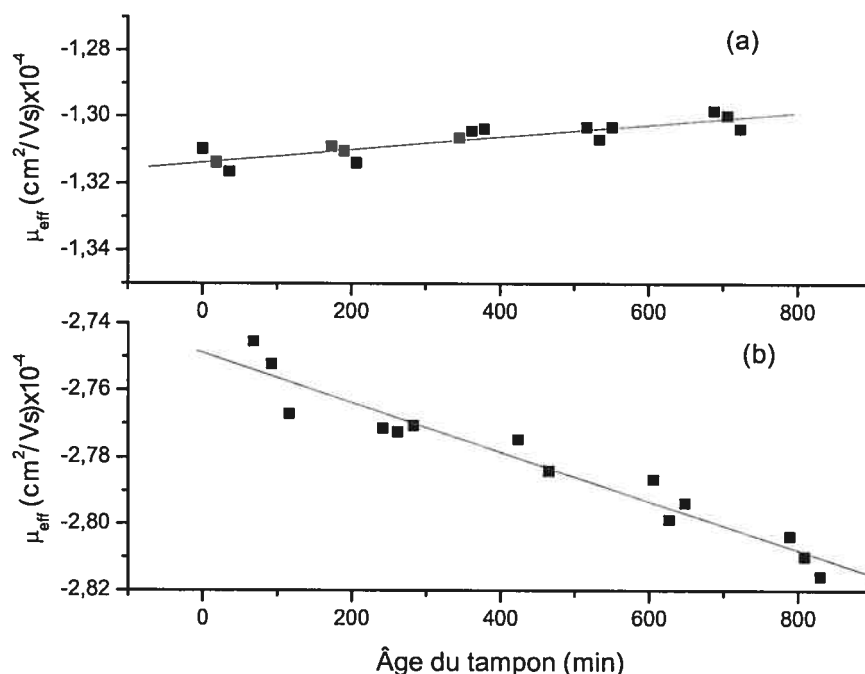


Figure 3.1 Influence du temps sur la mobilité (μ_{eff}) de la Met-enképhaline dans un tampon phosphate I = 106 mM, pH 8,1 contenant : (a) 0 mM SDS ($F = 43$, $R^2 = 0,7669$), (b) 50 mM SDS ($F = 177$, $R^2 = 0,9365$).

triplicata ont une mobilité effective anormalement basse. Cette divergence est probablement due au manque de temps laissé au capillaire pour atteindre l'équilibre au pH de travail lors du conditionnement de ce dernier. Ce problème est toutefois évité lors de la détermination de constante d'association ou de CMC, puisque avant le début de l'expérience, le capillaire est laissé au repos quelques heures en présence de tampon. Le reste des données montre la tendance prise par la mobilité effective à pH 7,0. La variation est toutefois beaucoup moins importante dans ces conditions qu'à pH 8,1. En effet, la variation de mobilité effective par minute est dix fois plus grande à pH 8,1 qu'à pH 7,0, c'est-à-dire respectivement : $-7,4 \times 10^{-9} \text{ cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1} \text{min}^{-1}$ et $-6,0 \times 10^{-10} \text{ cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1} \text{min}^{-1}$. Le capillaire étant thermostaté à 33°C dans l'expérience à pH 8,1, l'hydrolyse se produit plus rapidement que dans l'étude Leu-Phe-SDS où le capillaire était maintenu à 20°C; la mobilité effective du peptide en est donc plus affectée à température plus haute. D'autre part, le courant obtenu au cours des séparations faites à pH 7,0 (figure 3.2b) montre clairement une augmentation totale de

0,8 μA . Ce phénomène se produit aussi à pH 8,1 (données non présentées). En effet, cette variation est la preuve indirecte de la dégradation du SDS, puisque les ions sulfates qu'elle produit ont une mobilité beaucoup plus grande que les monomères de SDS, ce qui crée l'augmentation de courant.

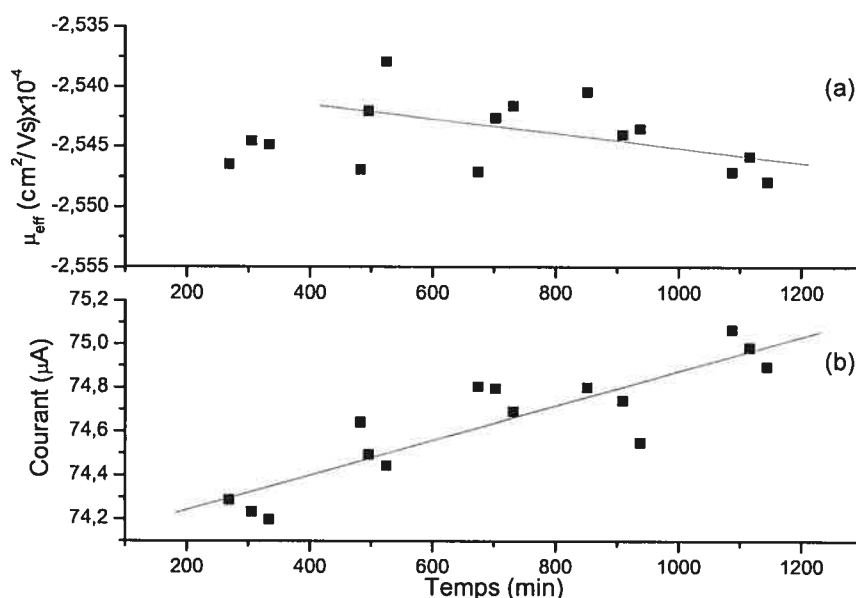


Figure 3.2 Progression dans le temps : (a) de la mobilité de la Met-enképhaline et ($F = 2,7$, $R^2 = 0,7703$) (b) du courant dans le capillaire ($F = 44$, $R^2 = 0,2143$), pour un tampon phosphate I = 94 mM, pH 7,0 contenant 50 mM de SDS.

Malgré le fait que les coefficients de corrélation des figures 3.1 et 3.2 soient plutôt bas (0,2143-0,9365), ces résultats démontrent l'importance de préparer des solutions fraîches avant chaque expérience et d'utiliser ces dernières le plus rapidement possible. En effet, sans être très précises, les régressions montrent tout de même une tendance claire. C'est pourquoi il faut être conscient de l'influence de l'hydrolyse du SDS sur les résultats finaux obtenus par électrophorèse capillaire. D'autre part, une étude similaire a été faite avec le CTAB (données non présentées) et les variations de mobilité effective en fonction du temps se sont révélées du même ordre de grandeur que l'incertitude obtenue sur trois mesures successives faites dans le même tampon. Il est donc impossible de prouver que l'âge du tampon contenant des micelles de CTAB a une influence

sur les données. D'autre part, la littérature ne fait aucune mention de l'hydrolyse ou de la dégradation du CTAB en solution aqueuse.

Il a ensuite été nécessaire de déterminer la CMC des surfactants, puisque les données servant au calcul des constantes d'association doivent être mesurées en milieu micellaire seulement. De plus, ce paramètre est utilisé dans le calcul des constantes. La figure 3.3 montre l'influence de la concentration de SDS sur la mobilité effective de la Met-enképhaline dans un tampon phosphate de force ionique de 106 mM et de pH 8,1. Pour déterminer la CMC du SDS à partir de la figure 3.3, il est nécessaire de faire la régression non-linéaire des données dans la région prémicellaire (équ. 3.4) et dans la région micellaire (équ. 3.5), de manière à pouvoir utiliser les équations résultantes pour déterminer leur point d'intersection[59]. Dans la figure 3.3, la courbe obtenue dans la région des concentrations prémicellaires est en fait une droite ayant une pente très faible ($(-3 \pm 2) \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$), car la constante d'association entre la Met-enképhaline et les monomères de SDS, K_{A-S} , est très petite et la mobilité effective du peptide est donc presque égale à sa mobilité électrophorétique. La concentration de SDS au premier point d'inflexion de la courbe représentée dans la figure 3.3 est habituellement nommée CAC[59], et se situe à 1,5 mM sur cette dernière. D'autre part, la concentration c_2 du SDS en présence de Met-enképhaline dans le tampon phosphate de force ionique de 106 mM est 6,8 mM. Ce comportement indique que la micellisation du SDS dans un tampon de force ionique de 106 mM de cette enképhaline se produit dans l'intervalle de concentration allant de 1,5-6,8 mM. Le tableau 3.1 montre que les valeurs de CAC et de CMC varient selon la composition du tampon. L'effet du pH du tampon est montré dans le tableau 3.2.

Puisque la CMC du SDS dans l'eau est bien connue[66] et que Lin et al.[59] ont aussi utilisé un tampon phosphate ayant un pH de 7,0, l'effet de la concentration sur la micellisation et la CMC a pu être examiné. En effet, des concentrations de 0,01 et 0,02 M de phosphate ont été utilisées par ces derniers, tandis qu'une concentration de 0,05 M a été utilisée dans le présent travail. À l'aide de pyridines, qu'ils ont choisies comme analyte, ils ont obtenu les valeurs

de CMC présentées dans le tableau 3.1. La CMC diminue à mesure que la concentration en phosphate du tampon augmente. En fait, l'électrolyte neutralise la charge à la surface des micelles, il réduit l'épaisseur de l'atmosphère ionique autour des têtes ioniques du surfactant et les répulsions électrostatiques entre ces dernières et aide de cette façon le procédé de micellisation[66].

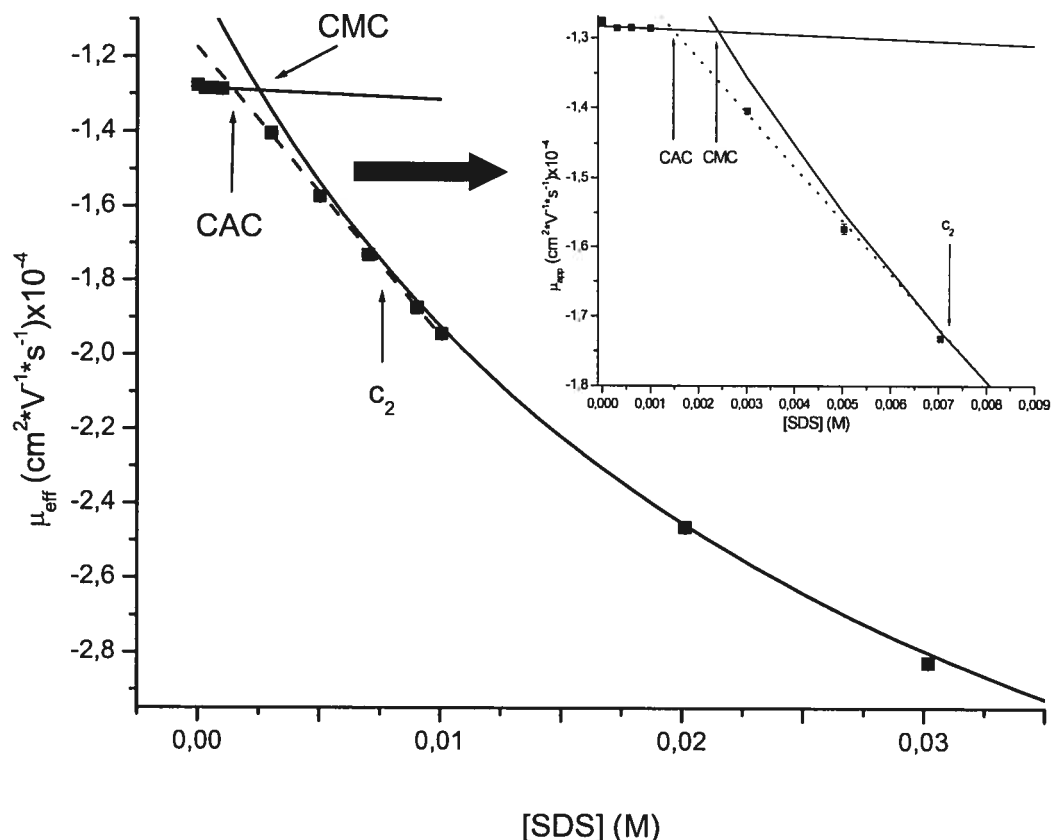


Figure 3.3 Variation de la mobilité effective de la Met-enképhaline en fonction de la concentration de SDS. Tampon phosphate I = 106mM, pH 8,1.

La CAC montre la même tendance. L'agrégation est donc aussi vraisemblablement facilitée par le même processus agissant sur les micelles. D'autre part, la concentration c_2 augmente avec la concentration en phosphate. L'effet de la concentration du tampon en phosphate sur les têtes ioniques du surfactant permet donc le maintien des agrégats à des concentrations plus élevées, augmentant ainsi la concentration c_2 à laquelle les micelles libres apparaissent dans la solution tampon. Le résultat global de l'augmentation de la concentration

en phosphate du tampon est donc un élargissement de l'intervalle de concentration de SDS où se produit l'agrégation des monomères sur le peptide. Puisque l'intérêt de la détermination de constante d'association est uniquement dirigé vers les micelles, la formation d'agrégats n'est pas souhaitable. En effet, il est possible qu'il existe toujours une certaine proportion de molécules de surfactant qui préfèrent s'agréger plutôt que de former des micelles, de la même façon qu'il existe toujours des monomères, même à concentration élevée.

Tableau 3.1 Comparaison des paramètres de micellisation (CMC) et d'agrégation (CAC) du SDS dans des tampons phosphate pH 7,0 de différentes concentrations.

Concentration en phosphate	CAC (mM)	CMC (mM)	c ₂ (mM)
0 M	-----	7,52-8,11 ^b	-----
0,01 M	3,0 ^a	4,0-6,1 ^a	4,5 ^a
0,02 M	2,0-3,0 ^a	2,8-4,8 ^{a, b}	4,5-6,0 ^a
0,05 M	1,1 ^c	1,6 ^c	7,3 ^c

^a de Lin, C.E. et al., *J. Chromatogr. A* 2001, 924, 89-91.

^b de Rosés, M. et al., *Langmuir* 2003, 19, 55-62.

^c résultats obtenus dans ce travail.

Le tableau 3.2 montre les autres CMC obtenues, afin de pouvoir calculer les constantes d'association dans ces mêmes conditions. La CMC obtenue pour le CTAB dans un tampon phosphate à pH 4,1 (0,79 mM) est très vraisemblable, puisqu'elle est logiquement plus petite, mais toutefois du même ordre de grandeur que celle qui apparaît dans la littérature (0,84 mM dans l'eau[67]). Il y a aussi une certaine similitude entre les valeurs de CAC, CMC et c₂ du SDS obtenues dans les tampons phosphate à pH 7,0 et 8,1. La composition en phosphate mono et dibasique est toutefois différente. Ainsi, le tampon ayant un pH de 7,0 contient une concentration plus grande d'ion Na⁺ (0,080 M) que le tampon pH 8,1 (0,074 M), il est donc prévisible que la CMC soit plus petite à pH

7,0. D'autre part, il est bien connu que le pH a aussi un effet sur la CMC des surfactants[59].

Étant donné que la viscosité du tampon influence non seulement la mobilité électroosmotique, mais aussi la mobilité électrophorétique d'un peptide, un facteur de correction de la viscosité a été calculé. La figure 3.4 montre la progression de ce facteur lorsque la concentration de SDS augmente dans la solution tampon. Il a toutefois fallu soustraire à chacun des temps d'élution, le temps nécessaire à l'appareil d'électrophorèse capillaire (0,15 min) pour atteindre la pression requise (0,1 psi ou 0,7 kPa), puisque l'équation de Poiseuille est vraie à pression constante seulement. Cette variation se traduit par une augmentation allant jusqu'à 8 % du facteur de viscosité pour les solutions de 50 mM de SDS (dans des solutions tampon ayant un pH de 8,1 et 7,0), tandis qu'une augmentation de 10 % se produit dans le cas du CTAB. L'augmentation est donc substantielle et doit être bien comptabilisée, afin de minimiser son impact sur les constantes d'association obtenues dans ces conditions.

Tableau 3.2 CAC, CMC et concentration c_2 du SDS et du CTAB dans des tampons phosphates ayant $I \approx 100$ mM

pH du tampon	Surfactant	CAC (mM)	CMC (mM)	c_2 (mM)
4,1	CTAB	----- ^a	0,79	----- ^a
7,0	SDS	1,1	1,6	7,3
8,1	SDS	1,5	2,5	6,8

^a Valeurs non-détectables.

3.5 Conclusion

Les systèmes micellaires sont très sensibles au pH, ainsi qu'à la force ionique du tampon. La température, le type de tampon, le type de contre-ion et les additifs utilisés dans l'électrolyte de support sont tous des facteurs influençant la micellisation des surfactants[59]. Connaissant toutefois l'instabilité du SDS en solution aqueuse, l'impact de l'hydrolyse du SDS a été évalué sur la mobilité

effective. Une plus grande hydrolyse a été observée dans le tampon ayant un pH de 8,1 et ce, probablement à cause de la température plus grande (33°C) utilisée dans cette étude (comparativement à 20°C utilisée avec le tampon ayant un pH de 7,0). Compte tenu de la durée d'acquisition nécessaire à l'obtention d'une constante d'association (12 heures en électrophorèse capillaire), la dégradation du SDS a probablement un certain impact sur la détermination de cette constante. Cet impact n'est toutefois pas assez important pour jeter un doute valable sur la validité des constantes obtenues. En ce qui concerne le CTAB, aucune variation notable de la mobilité effective n'a été observée en fonction de l'âge du tampon micellaire. Il semble en effet, que l'incertitude calculée sur trois mesures successives effectuées dans la même solution tampon est du même ordre de grandeur que la variation apparente de mobilité effective sur une longue période. Il est donc impossible d'en attribuer la cause à la dégradation du CTAB.

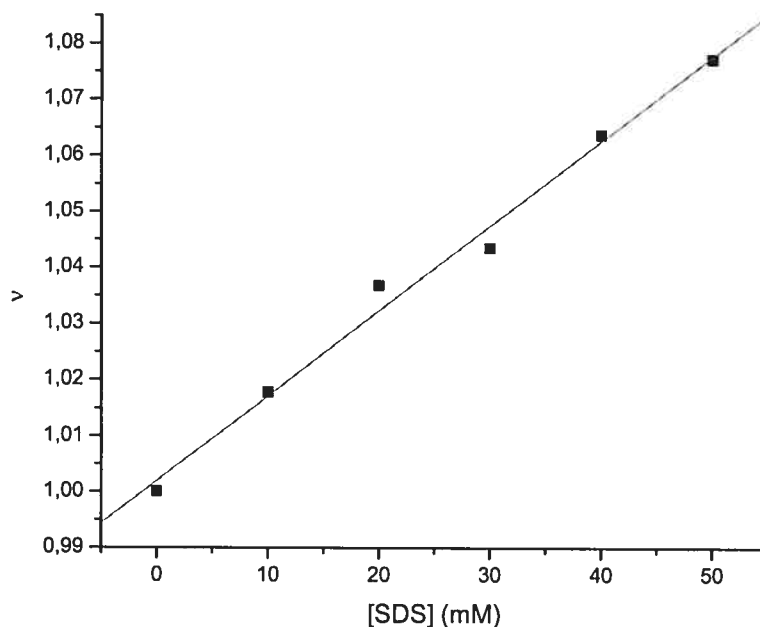


Figure 3.4 Variation du facteur de correction de la viscosité, v , causée par l'augmentation de la concentration de SDS dans un tampon phosphate ayant un pH de 8,1 et une force ionique de 106 mM.

La CMC du SDS et du CTAB a ensuite été facilement déterminée par la variation de mobilité effective en électrophorèse capillaire. L'influence de la force ionique sur la micellisation et l'agrégation s'est révélée importante, puisque la CAC et la CMC sont inversement proportionnelles à la concentration du tampon en électrolytes, tandis que la concentration c_2 augmente avec la concentration du tampon. Il en résulte un agrandissement de la zone de concentration en SDS où les monomères s'agrègent au lieu de former des micelles libres. Cette situation n'est pas favorable à la détermination de constantes d'association, puisque seules les micelles présentent un intérêt. La variation de la viscosité relative a finalement été étudiée. Des augmentations de 8 % (SDS) et de 10 % (CTAB) par rapport au tampon sans surfactant ont été observées, ce qui démontre l'utilité du facteur de correction de la viscosité. En effet, ce facteur permet de convertir les mobilités effectives observées à un état idéal, où la concentration en surfactant tend vers zéro[23].

L'appareil d'électrophorèse capillaire a donc permis de bien caractériser les systèmes micellaires utilisés lors de la détermination de constante d'association. L'hydrolyse du SDS a toutefois été négligée dans le calcul de cette dernière. Il serait toutefois intéressant de développer un facteur qui corrigerait la mobilité effective en tenant compte de la dégradation du SDS. Une approche plus directe consisterait à utiliser un carrousel thermostaté qui maintiendrait les vials de tampon à 15°C jusqu'au moment où l'analyse serait faite. En ce qui concerne la force ionique des tampons utilisés, il aurait été préférable d'utiliser des tampons moins concentrés afin de réduire la zone de concentration de SDS où se produit l'agrégation plutôt que la micellisation.

**4. Comparaison des constantes d'association
obtenues à partir de chacun des
chromophores présents dans la
Met-enképhaline**

4.1 Introduction

Certaines différences ont été observées entre les constantes d'association évaluées par CE et par spectrophotométrie. Dans le chapitre 2, seul le déplacement du maximum d'absorbance de la tyrosine des enképhalines a été suivi, tandis qu'en électrophorèse capillaire, le déplacement de la mobilité effective est dû à toutes les interactions qui existent entre le peptide et les micelles. D'autre part, la phénylalanine se retrouve aussi dans les enképhalines et nous voulons savoir si elle contribue à l'association par son hydrophobicité importante. La constante d'association de chacun des chromophores présents dans la Met-enképhaline a donc été évaluée dans le but d'expliquer les différences qui existent entre les deux techniques utilisées dans le chapitre 2 pour estimer les K_{as} .

La spectrophotométrie différentielle possède un large éventail d'applications. Elle est en effet utilisée dans l'analyse d'échantillons biologiques[68], alimentaires[69], environnementaux[70] et pharmaceutiques[71, 72]. Ce type de spectroscopie permet d'augmenter les différences entre deux spectres afin de résoudre deux bandes qui se chevauchent lors d'une analyse qualitative et de réduire les interférences provenant de la diffusion de la lumière, de la matrice ou d'autres composés absorbant dans la même région du spectre en analyse quantitative. Il se produit toutefois une diminution du rapport signal/bruit causée par le processus de dérivation. Cette diminution s'accroît à mesure que l'ordre de la dérivée est augmenté. Par contre, le grand avantage de cette technique est qu'elle discrimine les bandes d'absorption larges par rapport aux bandes étroites. Cette discrimination résulte du fait que l'amplitude (D^n) d'une bande Gaussienne dans la n^e dérivée est inversement proportionnelle à la largeur de bande originale (W) à la puissance n , selon :

$$D^n \propto \frac{1}{W^n} \quad (4.1)$$

Donc pour deux bandes d'intensité égale et de largeurs différentes qui coïncident sur le spectre d'ordre zéro, l'amplitude de la n^e dérivée de la bande étroite (X) est

plus grande que celle de la bande large (Y) par un facteur qui dépend de la largeur relative de la bande et de l'ordre de la dérivée :

$$\frac{D_X''}{D_Y''} = \frac{W_Y''}{D_X''} \quad (4.2)$$

Il est toutefois à noter que les pics les plus étroits proviennent du bruit. La technique polynomiale de Stavizky-Golay permet de contourner ce problème, puisqu'elle a la propriété de lisser le spectre dérivé ce qui permet d'atténuer la diminution du rapport signal sur bruit. Un soin particulier a été pris pour ne pas utiliser un degré de lissage trop élevé, ce qui aurait pour effet de déformer la dérivée du spectre[73].

El-Gindy et al.[71] ont exploité les caractéristiques de la 3^e dérivée afin de déterminer simultanément la teneur des deux ingrédients actifs présents dans des comprimés utilisés pour combattre l'hypertension. Grâce à cette méthode, ils ont résolu le problème de chevauchement des spectres de ces deux produits. Pour ce faire, ils ont mesuré les valeurs de l'amplitude à 217,4 nm (hydrochlorothiazide croise l'abscisse à l'origine) et à 233,4 nm (lisinopril croise l'abscisse à l'origine) sur le spectre de 3^e ordre, puisque ces dernières sont proportionnelles à la concentration de lisinopril et d'hydrochlorothiazide respectivement[74-76].

Dans le cas de la Met-enképhaline, la 3^e dérivée a permis de localiser précisément la position du maximum d'absorbance du cycle aromatique de la phénylalanine ($\lambda_{\max} = 257$ nm) sans interférence de la bande de la tyrosine ($\lambda_{\max} = 275$ nm).

4.2 Matériels et méthodes

4.2.1 Provenance des produits

La Leu-Phe (pureté > 99 %) a été achetée de la compagnie Bachem (Torrance, CA, USA). La Leu-enképhaline (pureté : 98 %), la Met-enképhaline (pureté : 98 %), le SDS (pureté > 99 %) et le CTAB (pureté ~ 99 %) ont été obtenus de Sigma-Aldrich Canada (Mississauga, ON, Canada) et ont été utilisés directement sans aucune autre forme de purification. Le phosphate de sodium

monobasique et dibasique ont été obtenus d'Anachemia (Montréal, QC, Canada). L'acide phosphorique a été acheté de A&C Chemical (Montréal, QC, Canada). L'eau distillée a été purifiée à l'aide d'un système Milli-Q (Millipore Canada, Nepean, ON, Canada) et a été utilisée dans la préparation de toutes les solutions tampons, de tous les échantillons et de toutes les solutions de rinçage. Le N-acetyl-tyrosinamide (Ac-Tyr-NH₂) (pureté > 99 %) a été acheté de la compagnie Sigma-Aldrich.

4.2.2 Préparation des tampons et des échantillons

Les solutions mères de peptides (1 mg/ml) ont été préparées dans l'eau et entreposées à -20°C. Les mélanges d'analytes ont été dilués dans du tampon afin d'obtenir une concentration finale, pour chacun des peptides, d'environ 0,2 mM. Les mesures spectroscopiques ont été effectuées individuellement sur chacun des peptides.

Les solutions tampons ayant des pH de 4,1 et 8,1 ont été préparées en mélangeant une quantité appropriée de phosphate de sodium monobasique et dibasique pour obtenir une force ionique d'environ 100 mM (pH 4,1, I = 110 mM: 110 mM NaH₂PO₄, 24 µl H₃PO₄; pH 8,1, I = 106 mM: 1,8 mM NaH₂PO₄, 36,1 mM Na₂HPO₄). Elles ont ensuite été titrées avec quelques microlitres d'acide phosphorique ou d'hydroxyde de sodium, afin d'obtenir le pH désiré. Les solutions mères de CTAB et de SDS ont été préparées dans l'eau pour ensuite être ajoutées à une quantité appropriée de solution tampon, afin de donner des concentrations finales allant de 10 à 50 mM.

4.2.3 Spectrophotométrie UV-Visible différentielle

Les spectres d'absorption ont été obtenus à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible Cary-100 Bio (Varian Instruments, Mississauga, ON, Canada). Des balayages allant de $\lambda_{\text{max}} - 10$ nm à $\lambda_{\text{max}} + 10$ nm (λ_{max} est égale à 276 nm pour les enképhalines et est égale à 258 nm pour la Leu-Phe) ont été fait à une vitesse de 15 nm/min. La 1^{ère} dérivée a été effectuée à l'aide d'Origin 6.0[®] (Microcal Software Inc., Northampton, MA, USA) et 13 points adjacents ont été utilisés

afin de lisser cette dérivée. D'autre part, la 3^e dérivée a été réalisée avec le logiciel Cary WinUV qui utilise l'équation Savitzky-Golay (taille du filtre : 13; intervalle : 0,1 nm), afin d'obtenir la dérivée lissée du spectre UV-Vis . Ces deux dérivées croisent l'abscisse à l'origine au λ_{max} .

4.3 Résultats et discussion

La figure 4.1a montre bien l'additivité des bandes d'absorbance dans un spectre UV-Vis. On remarque que le spectre de la Met-enképhaline entre 240 et 305 nm est en fait l'addition des bandes d'absorbance provenant de la Tyr et de la Phe, Leu-Phe ayant été utilisé pour obtenir le spectre du résidu aromatique de cet acide aminé. Comme la Phe a une absorptivité molaire beaucoup plus petite que la Tyr, elle apparaît seulement comme un épaulement de faible intensité sur le spectre de la Met-enképhaline qui comporte ces deux acides aminés aromatiques. Il est donc très laborieux d'identifier le maximum d'absorbance de la Phe sur le spectre d'ordre zéro. Le spectre de premier ordre (figure 4.1b) montre le même problème que le spectre d'ordre zéro. À cause du phénomène d'additivité, qui est aussi vrai pour la première dérivée du spectre d'absorbance, le spectre de la Met-enképhaline ne croise pas l'abscisse à l'origine au maximum d'absorbance de la Phe. En effet, la Tyr possède une absorbance positive dans la région du spectre de la Met-enképhaline avoisinant 257 nm. Toutefois, cette bande est très large et elle n'apparaît donc pas sur le spectre de 3^e dérivée (figure 4.1c) contrairement à celle de la Phe qui est beaucoup plus étroite. Il est donc possible avec le spectre de 3^e ordre de bien discriminer l'effet de l'absorbance de la Tyr sur celle de la Phe et ainsi déterminer simultanément le maximum d'absorbance des résidus de ces acides aminés dans la Met-enképhaline. Il n'y a pas non plus d'interférence de la Phe sur la bande de Tyr, puisque le signal de Phe oscille clairement autour de zéro à 275 nm.

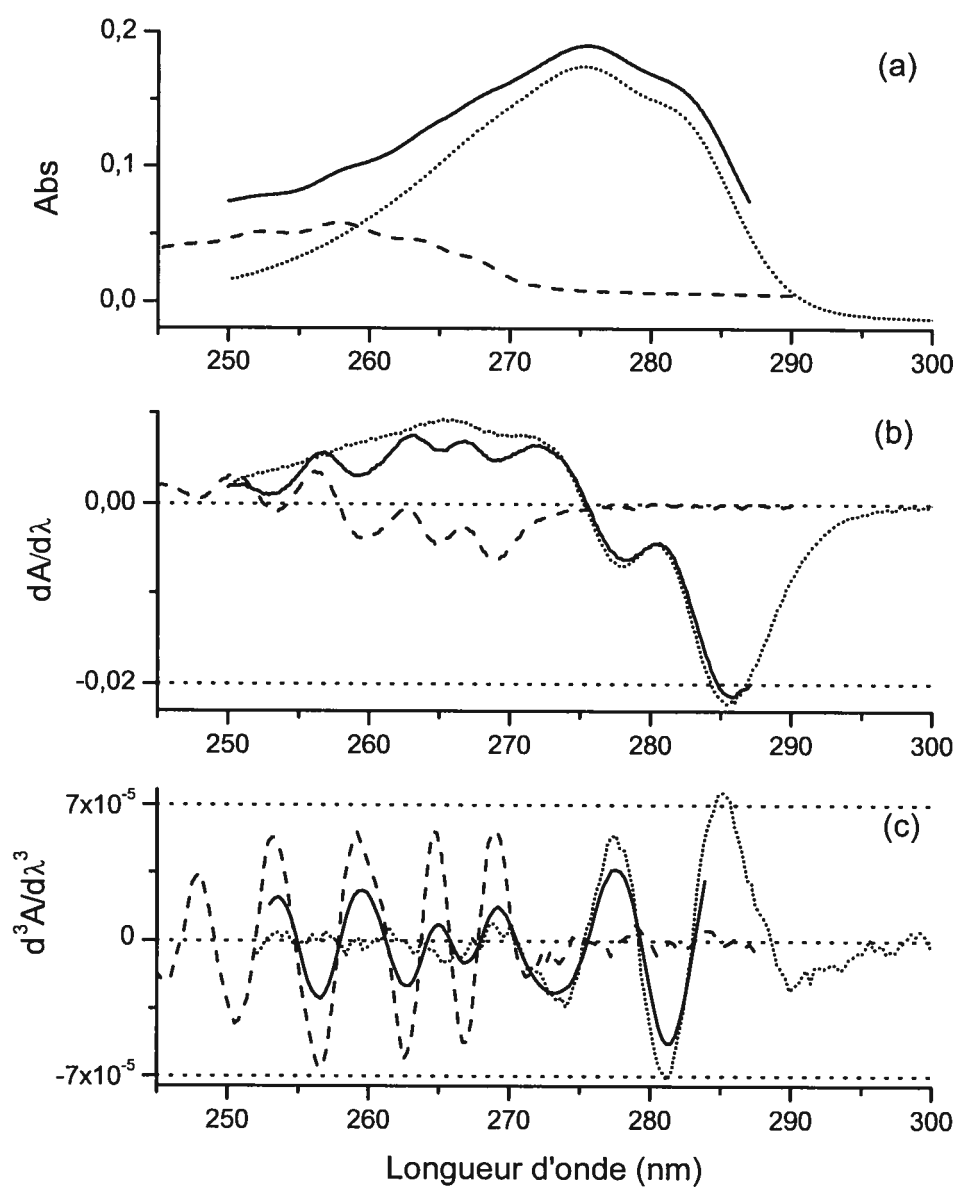


Figure 4.1 Spectres d'absorption (a) d'ordre zéro, (b) de première dérivée et (c) de troisième dérivée de la Met-enképhaline (—), de Leu-Phe (---) et de Ac-Tyr-NH₂ (...) dans un tampon phosphate I=106 mM, pH 8,1.

En ce qui concerne la détermination du maximum d'absorbance de la Tyr dans la Met-enképhaline, la figure 4.1b montre clairement que l'absorbance de la Phe est nulle au maximum d'absorbance de la Tyr (275 nm). La détermination de

constante d'association par la première dérivée au maximum d'absorbance de la Tyr dans les enképhalines n'est donc pas influencée par la Phe.

Le tableau 4.1 montre la valeur des constantes d'association obtenues à partir de la 3^e dérivée. La comparaison des écarts types faite en utilisant le test F, révèle qu'il n'y a pas de différence significative entre les différentes variances (F moins de $F_{2,2} = 39$ ($P = 0.05$)), sauf dans le cas où $K_{as(Tyr)}$ obtenue à partir de la 3^e dérivée, est comparée à toutes les autres constantes. Ce constat fait ressortir la moins grande précision résultant de l'utilisation de la 3^e dérivée dans la détermination de constante apparente d'association en présence de SDS. Dans le cas où des micelles de CTAB ont été utilisées, la constante d'association apparente estimée en utilisant le spectre de la Phe ($K_{as(Phe)}$) est presque deux fois plus grande que $K_{as(Tyr)}$, la constante apparente estimée à partir du spectre de la Tyr. Ceci est logique, puisque la Tyr a probablement des interactions dues à un dipôle induit entre le groupement OH de la tyrosine et la surface des micelles de CTAB (voir section 2.3). Il y aurait après cette étape, un repliement du peptide permettant l'inclusion préférentielle de la Phe qui est plus hydrophobe. Les enképhalines ne sont en effet pas très rigides, mais elles ont toutefois tendance à opter pour une conformation préférentielle en présence de micelles[2-4, 40, 52, 77]. La constante d'association apparente, $K_{as(Tyr)}$, a ensuite été calculée à partir de la 1^{ère} dérivée (voir la section 2.1.3) afin de faire la comparaison avec $K_{as(Tyr)}$ obtenus avec la 3^e dérivée et avec les constantes présentées dans le tableau 2.4.

Dans le cas des résultats obtenus avec le CTAB, la $K_{as(Tyr)}$ ($280 \pm 10 \text{ M}^{-1}$) est différente de celle présentée dans le tableau 2.2 ($213 \pm 9 \text{ M}^{-1}$), puisqu'un lot différent et beaucoup plus récent de CTAB a été utilisé. Ces deux constantes sont toutefois relativement près l'une de l'autre et selon la fonction F, il n'y a pas de différences significatives entre leur variance respective ($F = 1,2$). Il n'existe donc pas une différence très grande entre les deux lots à part le fait que le plus ancien des deux a probablement absorbé un peu d'humidité. D'autre part, $K_{as(Tyr)}$ obtenue avec la 1^{ère} dérivée en présence de CTAB ($280 \pm 10 \text{ M}^{-1}$) ne correspond pas à celle déterminée avec la 3^e dérivée ($170 \pm 10 \text{ M}^{-1}$). Cette différence est probablement imputable à la diminution importante du S/N causée par

l'application de la 3^e dérivée. Concrètement, cette diminution agit directement sur la linéarité des données utilisées pour déterminer la constante d'association (R^2 allant de 0,8830 à 0,9811 et F obtenu par la méthode ANOVA allant de 25 à 156 ce qui est plus petit que la valeur critique : $F_{1,3} = 216$ ($P = 0.05$)). Les données obtenues avec les micelles de SDS sont affectées de la même façon.

Tableau 4.1 Comparaison des constantes d'association apparentes entre la Met-enképhaline et des surfactants obtenues à partir des spectres différentiels de Tyr ou de Phe

Agent Micellant ^a	$K_{as(Tyr)} (M^{-1})$		$K_{as(Phe)} (M^{-1})$
	1 ^{ère} dérivée	3 ^e dérivée	3 ^e dérivée
Micelles de SDS	60 ± 10	220 ± 80	60 ± 10
Micelles de CTAB	280 ± 10	170 ± 10	310 ± 40

^a Conditions : 33°C, pH 8,1 pour l'étude des micelles de SDS; 25°C, pH 4,1 pour les micelles de CTAB. L'écart type présenté a été calculé à partir de trois constantes obtenues indépendamment ($n = 3$).

En présence de micelles de SDS, $K_{as(Tyr)}$ est presque quatre fois plus grand que $K_{as(Phe)}$. Hicks et al.[4] ont démontré que les résidus de Tyr et de Phe ne s'insèrent pas dans la phase micellaire du SDS. Le déplacement du maximum d'absorbance est donc dû à la conformation qu'adopte la Met-enképhaline en présence de SDS. Cette structure préférentielle est en fait stabilisée par des interactions aromatiques-aromatiques entre les résidus de Tyr et de Phe présents dans une même molécule de Met-enképhaline. Il se produit aussi des interactions hydrophobes entre les cycles aromatiques et les résidus alkyles de Tyr, Phe et Met[4]. Cette organisation de la structure du peptide à l'interface micelle-solvant est donc responsable du déplacement du maximum d'absorbance de la Phe et la Tyr dans la Met-enképhaline. Les constantes spectroscopiques obtenues à partir de ces dernières ne donnent donc aucune information directe sur leur contribution respective à l'association, puisqu'il n'y a pas d'insertion dans la phase micellaire.

Selon l'importance des constantes calculées, il semble que l'environnement du cycle aromatique de la Tyr ($220 \pm 80 \text{ M}^{-1}$) subisse un changement plus important que celui de la Phe ($60 \pm 10 \text{ M}^{-1}$) lorsque la concentration de SDS varie. Il y a donc probablement plus d'interactions hydrophobes entre la Met et la Tyr qu'entre la Met et la Phe.

D'autre part, $K_{as(\text{Tyr})}$ calculée par la 1^{ère} dérivée ($60 \pm 10 \text{ M}^{-1}$) est du même ordre de grandeur, mais ne concorde pas exactement avec la valeur apparaissant dans le tableau 2.4 ($12 \pm 3 \text{ M}^{-1}$). Cette divergence résulte probablement du temps plus long passé par les solutions à 33°C. En effet, il faut balayer un plus large intervalle de longueur d'onde afin de déterminer $K_{as(\text{Tyr})}$ et $K_{as(\text{Phe})}$ par la 3^e dérivée (37 nm) comparativement à la méthode utilisant la 1^{ère} dérivée (12 nm). Comme la vitesse de balayage est la même dans les deux méthodes et que les solutions sont placées à l'avance dans l'appareil afin de laisser le temps à l'équilibre de se stabiliser à la température voulue, l'hydrolyse du SDS est plus importante dans la méthode utilisant la 3^e dérivée. Étant donné que les différentes solutions de SDS ne passent pas nécessairement toutes le même temps dans l'appareil, il y a donc un impact sur la linéarité des données dans la fonction inverse. Il est intéressant de voir que la dégradation du SDS se traduit en une augmentation des interactions entre les micelles et les peptides. Ce phénomène est en parfait accord avec les observations faites dans la section 3.4 lors de l'étude de stabilité du SDS.

Finalement, il est étonnant de constater que $K_{as(\text{Tyr})}$ obtenue avec la première dérivée coïncide assez bien avec $K_{as(\text{Phe})}$ et ce dans les deux systèmes micellaires. Pour l'instant le manque de données rend la formulation d'une hypothèse difficile.

4.4 Conclusion

Comme il a été démontré précédemment, il est possible de discriminer les bandes d'absorbance des résidus de Phe et de Tyr à partir de la 3^e dérivée, même si ces deux acides aminés sont présents dans un peptide. Il est toutefois plus difficile de déterminer des constantes d'association à partir de cette dérivée,

puisque dans ces conditions, le fond spectral augmente beaucoup l'incertitude sur les mesures prises à chacune des concentrations en surfactant. Les constantes résultantes ne sont donc pas très précises, mais elles donnent tout de même une information pertinente sur le mécanisme d'association dans le cas où le peptide interagit avec la phase micellaire (Met-enképhaline-CTAB). Elle permet aussi d'identifier les résidus qui contribuent le plus à la stabilisation d'une conformation préférentielle d'un peptide demeurant à l'interface micelle-solvant (Met-enképhaline-SDS).

Certains détails permettraient de réduire l'incertitude sur les mesures, telle la réduction du temps que passe les solutions de SDS à 33°C. En effet le temps optimal permettrait d'atteindre l'équilibre tout en minimisant l'hydrolyse du SDS. Il serait aussi important de bien sécher le CTAB selon une méthode établie, ce qui minimiserait l'effet du taux d'humidité changeant dans le laboratoire, ainsi que les variations qui peuvent se produire entre deux lots différents. Il serait finalement intéressant d'effectuer la détermination des constantes d'association avec d'autres peptides comportant plusieurs chromophores différents. Cette expérience permettrait de mieux comprendre les similitudes et les différences remarquées entre $K_{as(Tyr)}$ et $K_{as(Phe)}$ obtenues à partir de la 1^{ère} et de la 3^e dérivée.

5. Étude des interactions peptides-micelles polymériques par électrophorèse capillaire

5.1 Introduction

Les polymères solubles dans l'eau comprenant des monomères hydrophobes, ont été la cible d'études exhaustives au cours de la dernière décennie, à cause de leurs applications industrielles, comme les peintures à l'eau, les fluides de revêtement, les cosmétiques, la nourriture, les vecteurs de médicament (libération contrôlée), la récupération des huiles et le traitement des eaux, en plus de leur pertinence dans les systèmes biologiques macromoléculaires. Nous voulions étudier l'utilisation de polymères solubles comme phase pseudo-stationnaire dans la séparation de peptide en CE.

Dans les polyélectrolytes amphiphiles en solution aqueuse, les interactions hydrophobes sont en compétition avec les interactions électrostatiques répulsives. Il en résulte la formation d'une variété de nanostructures analogues aux micelles. L'auto-assemblage des copolymères amphiphiles aléatoires peut être contrôlé par l'architecture moléculaire qui comprend : la distribution dans la séquence des monomères hydrophobes et hydrophiles, le groupement séparant la chaîne hydrophobe de la chaîne du polymère et le type ainsi que le pourcentage de monomère hydrophobe dans le polymère. Le type de nanostructure varie beaucoup, puisqu'en solution aqueuse, tout repose sur l'association hydrophobe qui peut être intra ou intermoléculaire. Des associations intrapolymères hautement préférentielles mènent à la formation de micelles unimoléculaires, tandis que les associations interpolymères donnent une structure enchevêtrée donnant lieu au phénomène «d'épaississement». Ainsi, un copolymère aléatoire de 2-(acrylamido)-2-méthylpropanesulfonate de sodium (AMPS) et de méthacrylate hydrophobe, où la portion hydrophobe est liée à la chaîne de polymère par un groupement ester, tend à avoir des associations interpolymères même en solution diluée. Il en résulte la formation d'agrégats multipolymères analogues aux micelles[78]. D'autre part, un copolymère de AMPS et de méthacrylamide, où la partie hydrophobe est liée à la chaîne du polymère par un groupement amide, montre une forte préférence pour la formation d'associations intrapolymères dans l'eau[79, 80]. Il en résulte des micelles unimoléculaires

compactes, même lorsque la concentration en polymère est élevée[81]. Ce comportement est très intéressant, puisque contrairement aux surfactants classiques, il n'y a pas de CMC, ni de phénomènes d'agréation sur le peptide, ce qui simplifie la détermination de constante d'association et le mécanisme qui entoure l'association. De plus, les surfactants polymériques ont une plus grande stabilité face aux variations des paramètres de séparation, comme la concentration de surfactant, la température du capillaire, le pH du tampon, la force ionique de ce dernier et la concentration en solvant organique[18, 19, 21]. Ils peuvent aussi faciliter la détection par spectrométrie de masse lors de séparations en chromatographie électrocinétique (EKC). Plusieurs groupes fonctionnels peuvent être incorporés dans la chaîne du polymère afin de modifier la sélectivité de la phase pseudostationnaire[21].

Morishima et al. ont étudié en profondeur le comportement d'auto-association des copolymères de AMPS et de *N*-dodecyl-méthacrylamide (Dod)[79-83]. Ils en sont venus à la conclusion que les polymères possédant des chaînes allyles C_6 ou C_{12} tendent fortement à former des associations hydrophobes intramoléculaires. Il résulte de ces interactions, des micelles unimoléculaires lorsque le polymère contient 30-70 ou 10-50 mol % de chaînes C_6 ou C_{12} respectivement. Une tendance similaire a été observée pour des polymères possédant de 5 à 20 mol % de chaînes C_{18} , toutefois les micelles formées ne sont pas complètement unimoléculaires. Les limites supérieures et inférieures de monomères hydrophobes de ces trois polymères diminuent de façon significative lorsque la longueur de leurs chaînes alkyle augmente. Lorsque le pourcentage des monomères hydrophobes est plus petit ou plus grand que ces limites, les polymères interagissent entre eux et il y a alors association interpolymère. Au même ratio monomères hydrophobes sur monomères chargés dans une chaîne de polymère, les chaînes C_6 forment beaucoup moins efficacement des micelles unimoléculaires que les chaînes C_{12} et C_{18} . Il n'y a toutefois pas de différences significatives entre les chaînes C_{12} et C_{18} .

Nous avons donc choisi des copolymères de AMPS, Dod et py (*N*-(1-pyrénylméthyl)méthacrylamide) contenant 5 et 15 mol % de monomère Dod à

cause de leur tendance à former des micelles unimoléculaires (voir fig. 5.1 pour leur structure chimique). Comme l'ont démontré Palmer et al., cette famille de polymères a une grande solubilité dans l'eau et ce même à pH très acide[18-21]. Cette propriété nous a permis d'étudier les interactions de ces polymères avec une série de peptides sur une gamme étendue de pH. Trois peptides ont été choisis, afin de vérifier si les conclusions du chapitre 2 sur les micelles s'appliquent aux polymères qui ont été choisis. Puisque la charge et la polarité du premier résidu des acides aminés semblaient influencer grandement l'association entre le peptide et les micelles, Tyr-Phe (neutre et faiblement polaire), Leu-Phe (neutre et non-polaire) et Arg-Phe (positif et très polaire) en plus des deux enképhalines mentionnées précédemment ont été utilisés dans une étude préliminaire du déplacement de leur mobilité. Les constantes d'association entre deux peptides (Leu-Phe et Leu-enképhaline) et les micelles polymériques ont ensuite été déterminées à partir de différents modèles chimiques, dont celui décrivant des interactions peptide-copolymère 1:1 et 1:2 selon l'équilibre suivant[28] :

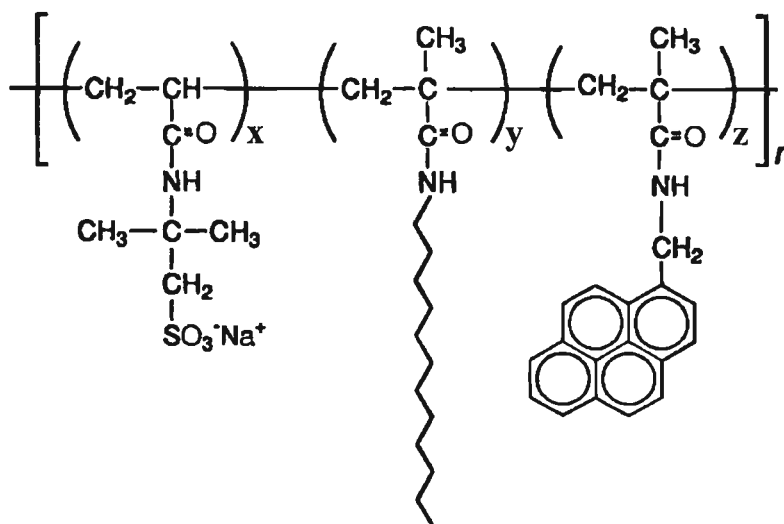
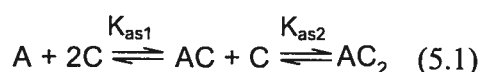


Figure 5.1 Structure des copolymères de AMPS, Dod et py ayant respectivement une abondance de $x = 80$ ou 90 mol %, $y = 5, 10$ ou 15 mol % et $z = 0$ ou 5 mol %[80].

Le modèle chimique utilisé pour les micelles ayant une stœchiométrie peptide-copolymère 1:1 a aussi été testé sans toutefois obtenir autant de succès. Il faut souligner que cette étude est très préliminaire. De plus, aucune autre étude portant sur l'association entre des petits peptides et des micelles polymériques formées de AMPS et de Dod.

5.2 Matériels et méthodes

5.2.1 Provenance des produits

La Leu-Phe (pureté > 99 %) a été achetée de la compagnie Bachem (Torrance, CA, USA). La Leu-enképhaline (pureté : 98 %) et la Met-enképhaline (pureté : 98 %), ont été obtenues de Sigma-Aldrich Canada (Mississauga, ON, Canada) et ont été utilisées directement sans aucune autre forme de purification. Le phosphate de sodium monobasique et dibasique ont été obtenus d'Anachemia (Montréal, QC, Canada). L'acide phosphorique a été acheté de A&C Chemical (Montréal, QC, Canada). L'eau distillée a été purifiée à l'aide d'un système Milli-Q (Millipore Canada, Nepean, ON, Canada) et a été utilisée dans la préparation de toutes les solutions tampons, de tous les échantillons et de toutes les solutions de rinçage. Les capillaires de silice fondue ont été achetés chez Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA). Les filtres de Nylon (pores de 0,2 μm de diamètre) ont été achetés chez Chromatographic Specialties (Brockville, ON, Canada). Arg-Phe et Tyr-Phe (pureté > 99 %) ont été obtenues de Sigma-Aldrich Canada. En ce qui concerne les polymères, ils ont gracieusement été fournis par le groupe de recherche de la professeure Winnick. Les copolymères ont été synthétisés de la façon décrite précédemment[84]. Les masses moléculaires de PAMPS 90 % Dod 5% py 5% et PAMPS 80 % Dod 15% py 5% sont respectivement 38000 et 28000 Dalton.

5.2.2 Préparation des tampons et des échantillons

Les solutions mères de peptides (1 mg/ml) ont été préparées dans l'eau et entreposées à -20°C. Les mélanges d'analytes ont été dilués dans du tampon afin d'obtenir une concentration finale, pour chacun des peptides, d'environ 0,2 mM.

Les solutions tampons ayant des pH de 2 et 4,1 ont été préparées en utilisant une quantité appropriée de phosphate de sodium monobasique pour obtenir une force ionique de 110 mM. Elles ont ensuite été titrées avec quelques microlitres d'acide phosphorique ou d'hydroxyde de sodium, afin d'obtenir le pH désiré. Les solutions mères de polymères ont été préparées dans le tampon approprié et ensuite diluées dans le même tampon pour obtenir des concentrations allant de 0,024 à 0,56 g/L.

5.2.3 Électrophorèse capillaire

Toutes les expériences ont été effectuées à l'aide d'un appareil P/ACE MDQ de Beckman Coulter. Une longueur d'onde de détection de 200 nm a été utilisée pour obtenir les électrophérogrammes. Les séparations ont été effectuées dans un capillaire de 50 μ m de diamètre interne ayant 21 cm de longueur effective et 31 cm de longueur totale. Les échantillons ont été injectés en appliquant une pression de 0,3 psi (2 kPa) pendant 5 s. Le voltage appliqué était de 11 kV.

Au début de chaque journée d'utilisation, le capillaire a été rincé avec du NaOH 0,1 M pendant 10 min, suivi d'eau pendant 10 min, de tampon pendant 6 min et finalement un potentiel de 25 kV a été appliqué pendant 15 min afin de bien stabiliser le capillaire. Le diméthyle sulfoxyde (0,2 % v/v) a été utilisé comme marqueur de flux électroosmotique. La mobilité des différents analytes a été évaluée de la façon décrite à la section 2.2.4.

Afin d'estimer les constantes d'association à partir des déplacements de mobilité en fonction de la concentration en copolymère, une équation tenant compte de la présence simultanée des stœchiométries d'association 1:1 et 2:1 a été utilisée[28].

$$\mu_{\text{eff}} - \mu_{A-aq} = \frac{(\mu_{A-C} - \mu_{A-aq})K_{as1}[C] + (\mu_{A-C_2} - \mu_{A-aq})K_{as1}K_{as2}[C]^2}{1 + K_{as1}[C] + K_{as1}K_{as2}[C]^2} \quad (5.2)$$

où μ_{A-C_2} est la mobilité de AC_2 et où K_{as1} et K_{as2} sont les constantes d'équilibre présentées dans l'équation 5.1. Les autres paramètres ont déjà été définis à la section 3.1.4.

5.3 Résultats et discussion

Une série de peptides a d'abord été utilisée dans une étude préliminaire ayant pour but d'identifier les types d'acides aminés interagissant le plus avec les polymères. La comparaison entre la mobilité électrophorétique des peptides obtenue dans le tampon ayant un pH donné et la mobilité effective résultant de la présence de 0,2 g/L de PAMPS 90% Dod 10% ajouté au même tampon a permis de révéler la présence d'interactions entre le polymère et le peptide (voir tableau 5.1). Contrairement aux micelles de SDS ou de CTAB, aucune interaction n'a été révélée par électrophorèse capillaire à pH 8,1 et ce même si le peptide comprenait un résidu à caractère positif, par exemple le Arg-Phe. Ce type de polymère a en effet la particularité d'opter pour une conformation très compacte (7,1 nm de diamètre dans une solution de NaCl 0,05 M)[82]. Le groupe de Palmer est toutefois parvenu à utiliser ces polymères afin de séparer une série de composés aromatiques neutres à pH 9,2[18, 19]. Les zones hydrophobes sont donc accessibles. Comparativement aux micelles de SDS, ce type de copolymère doit donc exercer une plus forte répulsion électrostatique sur le groupement carboxylique du peptide. Ce phénomène pourrait être causé par une plus forte densité des charges négatives à la surface des micelles polymériques. D'autre part, les micelles de SDS ont une structure dynamique qui est à l'équilibre avec les monomères de surfactant. Il est donc possible d'imaginer qu'à l'approche d'un peptide, les monomères s'agrègent de façon à former une micelle autour des portions hydrophobes du peptide, tout en évitant les groupements chargés négativement. Cette grande flexibilité des micelles de SDS n'est manifestement pas partagée par les copolymères, puisque les monomères hydrophobes sont liés à la chaîne du polymère. Cette rigidité des polymères nuit donc à leurs interactions avec les peptides. Progent et al. ont aussi observé des interactions polyélectrolytes anioniques/peptides à un pH très bas (pH de 3)[17]. Leur pH a été choisi afin de minimiser l'adsorption des peptides sur la paroi du capillaire et malheureusement aucune étude à pH plus élevé n'a été mentionnée dans l'article.

À pH 4,1, la mobilité effective de tous les peptides présentées dans le tableau 5.1 subit un déplacement, toutefois celui de la Leu-Phe et de la Tyr-Phe

est très faible. Il y a donc un certain parallèle avec les micelles de SDS. En effet, à ce pH les groupements amines sont protonnés et permettent donc des interactions électrostatiques avec les copolymères anioniques. Ensuite, l'insertion des groupements hydrophobes dans les microdomaines hydrophobes se produit probablement. Les résidus des acides aminés jouent aussi un rôle, puisque celui de l'arginine (positif et très polaire) cause un déplacement important, ce qui n'est pas le cas pour Leu-Phe (neutre et non-polaire) et pour Tyr-Phe (neutre et faiblement polaire). D'autre part, les enképhalines subissent une influence importante des copolymères causée probablement par la présence de deux cycles aromatiques dans leur structure et par la taille de ces peptides (5 acides aminés) qui permet une plus grande flexibilité.

Tableau 5.1 Détermination du pH auquel la mobilité d'une série de peptides subit un déplacement en présence de 0,2 g/L de PAMPS 90% Dod 10% par rapport à la mobilité électrophorétique

pH	Déplacement de la mobilité				
	Leu-Phe	Arg-Phe	Tyr-Phe	Leu-enképhaline	Met-enképhaline
2,0	oui	oui	oui	oui	oui
4,1	faible	oui	faible	oui	oui
8,1	non	non	non	non	non

À pH 2,0, tous les peptides subissent un déplacement important de mobilité effective. Ce changement de comportement peut être expliqué par la réduction des répulsions électrostatiques causée par deux phénomènes. D'une part, à ce pH les peptides ont la majorité de leur groupement carboxylique protonné. D'autre part, le copolymère est probablement partiellement ou majoritairement protonné (les pK_a du polymère ne sont pas connus), ce qui neutralise la charge négative des groupements sulfate. Les interactions entre le copolymère et les peptides sont donc majoritairement influencées par l'état de protonnation des

groupements amines et carboxyliques terminaux des peptides et des sulfates du copolymère. Il est aussi très concevable qu'à ce pH, il se produise une modification importante des nanostructures analogues aux micelles, causée par la diminution des répulsions entre les sulfates dans une même molécule de copolymère. La sélectivité des copolymères en serait ainsi complètement modifiée.

Le déplacement de mobilité effective de certains de ces peptides a aussi été testé à pH 2,0 avec des copolymères contenant 5% de py. Puisque la tendance semblait être la même avec ces derniers qu'avec ceux ne contenant pas de monomère de py et que deux pourcentages différents en monomères hydrophobes (5 ou 15 % de Dod) étaient disponibles, c'est avec ces derniers que la suite de l'étude a été effectuée. La comparaison entre la figure 2.4 et les figures 5.2a et b, montre une augmentation similaire du temps de migration des peptides. L'élargissement des pics est toutefois beaucoup plus significatif dans le cas où les polymères sont utilisés. Le phénomène est si important qu'il fait disparaître le pic de la Leu-enképhaline dans la ligne de base, comme le montre la figure 5.1a. Dans le cas des micelles conventionnelles, il est bien connu que leur taille n'est pas uniforme et qu'il y a par conséquent une distribution du nombre d'agrégation. Les différentes tailles de micelle semblent causer une distribution de vélocité électrophorétique, ce qui contribue à l'élargissement des pics. Toutefois, il est possible d'imaginer qu'une micelle est toujours à l'équilibre avec les monomères de surfactant et qu'un équilibre rapide est toujours établi au niveau de la taille des micelles. Conséquemment, la contribution de la taille des micelles sur l'élargissement des pics devrait être négligeable[85]. Ce n'est pas le cas pour les polymères qui forment des micelles unimoléculaires. En effet, la polydispersité des polymères fait qu'il y a une distribution fixe de la taille des micelles polymériques, ce qui contribue à l'élargissement des pics. Dans l'éventualité où les interactions intermoléculaires seraient importantes, il est très probable que l'équilibre entre les micelles polymériques et les molécules de polymère soit très lent à cause de la taille importante des molécules en question. Ce phénomène

créerait une distribution dans la taille des micelles et contribuerait au phénomène d'élargissement des pics de peptides.

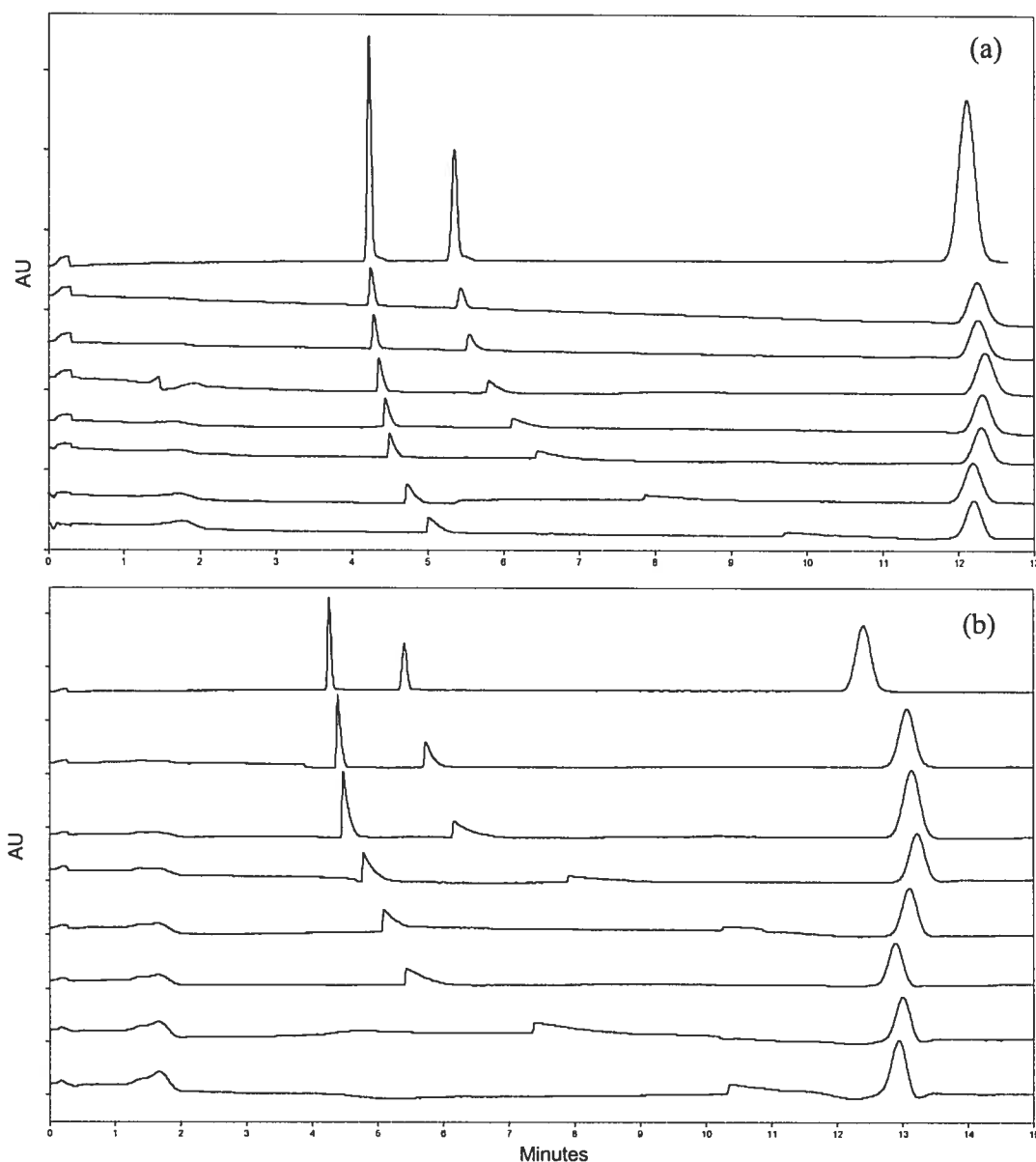


Figure 5.2 Effet de l'augmentation de la concentration (0 à 0,56 g/L de haut en bas respectivement) de PAMPS 90% Dod 5% py 5% (a) et de PAMPS 80% Dod 15% py 5% (b) sur le temps de migration de Leu-Phe et de la Leu-enképhaline (premier et deuxième pic respectivement). Tampon : I = 110 mM phosphate, pH 2,0, 11 kV, 25°C.

D'autre part, Progent et al.[17] ont étudié les constantes d'association entre des peptides (6-10 acides aminés) et des polyélectrolytes (poly(acide lactique-co-glycolique)). Ils ont aussi remarqué un certain élargissement de leur pic qui était proportionnel à la concentration en polymère. Ils soulignent qu'une cinétique lente de l'association entre les polymères et les peptides pourrait être responsable de l'élargissement. Toutefois, leur flux électroosmotique est très faible étant donné les conditions qu'ils ont employées (pH 3). Ils ont donc conclu qu'il était raisonnable d'assumer que le phénomène d'association est plus rapide que le phénomène de migration[17]. Dans le cas des copolymères et des peptides que nous avons utilisés afin d'obtenir la figure 5.2, les taux d'association et de dissociation sont probablement trop lents par rapport aux temps de migration et ne permettent pas que l'équilibre dynamique soit établi[30].

D'autre part, le marqueur de flux a des temps d'élution qui varient d'une concentration à l'autre en copolymère. Cette variation est sûrement due à la viscosité des différentes solutions (selon l'équation de Poiseuille), puisque la pression appliquée est la même pour chacune des injections et que le flux électroosmotique à pH 2 est négligeable. Il est donc très probable qu'il y ait des associations interpolymères au pH et à la force ionique utilisés. L'augmentation de la viscosité des solutions de polymères en fonction de leur concentration est en effet une caractéristique des associations interpolymères [79]. Il semble donc y avoir formation d'agrégats (polymères enchevêtrés) qui atteint un maximum à des concentrations de 2,4 et 3,4 μM pour les polymères comprenant respectivement 5 et 15 mol % de Dod dans leur structure. Le temps d'élution du marqueur diminue ensuite et se stabilise à une valeur plus grande que le temps obtenu dans le tampon sans polymère. Ce phénomène est peut-être dû à la formation d'une structure plus élaborée qui pourrait ressembler aux micelles multipolymères proposées par Noda et al.[78]. L'étude des k' de ce type de polymère effectuée par Shi et al.[19] suggère l'existence de deux microdomaines hydrophobes dans le polymère : un premier à basse concentration (moins de 0,17% (w/v)) de polymère et un second à concentration plus élevée (de 0,17 à 3% (w/v)). Ce comportement est typique des polyélectrolytes ionisés et démontre l'équilibre qui

existe entre les interactions intermoléculaires hydrophobes et les répulsions électrostatiques segmentaires. Ils ont en plus observé une augmentation importante de la mobilité électrophorétique du copolymère lorsque sa concentration passe de 0,4 à 0,17 % (w/v). Ceci constitue un autre indice du changement de structure du copolymère lorsqu'il est présent à faible concentration.

Les données extraites à partir des électrophérogrammes présentés à la figure 5.2 donnent le type de courbe présenté à la figure 5.3. Encore une fois, des similitudes apparaissent entre les micelles de SDS et les copolymères. Dans le cas du SDS (voir figure 3.3), un déplacement presque nul de la mobilité effective est observé à basse concentration, tandis que celui obtenu avec les copolymères est beaucoup plus important (à concentration plus petite que $2,4 \mu\text{M}$). En ce qui concerne les micelles de SDS, cette portion du graphique représente la phase prémicellaire, tandis que pour les copolymères, il semble se produire un changement de structure, ce qui confirme les observations faites précédemment à partir du changement de viscosité de la solution. En ce qui concerne les données de la figure 5.3 à plus haute concentration ($2,4\text{-}14,7 \mu\text{M}$), des similitudes apparaissent avec les micelles de SDS. En effet, le même type de courbe résultant de la phase micellaire de SDS semble se profiler dans le cas des polymères. Il est donc important de bien choisir les points qui serviront à faire la régression linéaire, puisque le comportement de la mobilité effective est fonction de la structure du copolymère comme le montre la fonction inverse (figure 5.4). Les données obtenues à basses concentrations s'éloignent en effet, de la relation linéaire.

Une tentative de détermination de constante d'association a ensuite été faite. La fonction inverse (voir éq. 2.2) a été utilisée afin de vérifier la stœchiométrie de l'association, puisque cette dernière est très efficace pour détecter la non-linéarité [28]. Il en résulte la figure 5.4. Cette dernière montre bien que les données ne sont pas linéaires sur toute la gamme. Il semble en effet, que les points expérimentaux à plus faible concentration s'éloignent du modèle chimique. Leur nombre dans cette région (2 points seulement) n'est pas assez

important pour permettre d'affirmer qu'ils suivent une relation linéaire, ce qui révélerait la présence de multiples associations à l'équilibre ayant une stoechiométrie 1:1 [17]. Si toutefois les données suivaient bien une relation linéaire dans cette région, K_{as} ne pourrait être obtenu à partir de ce modèle chimique, puisque la pente serait négative et l'ordonnée à l'origine positive, ce qui donne une constante d'association négative.

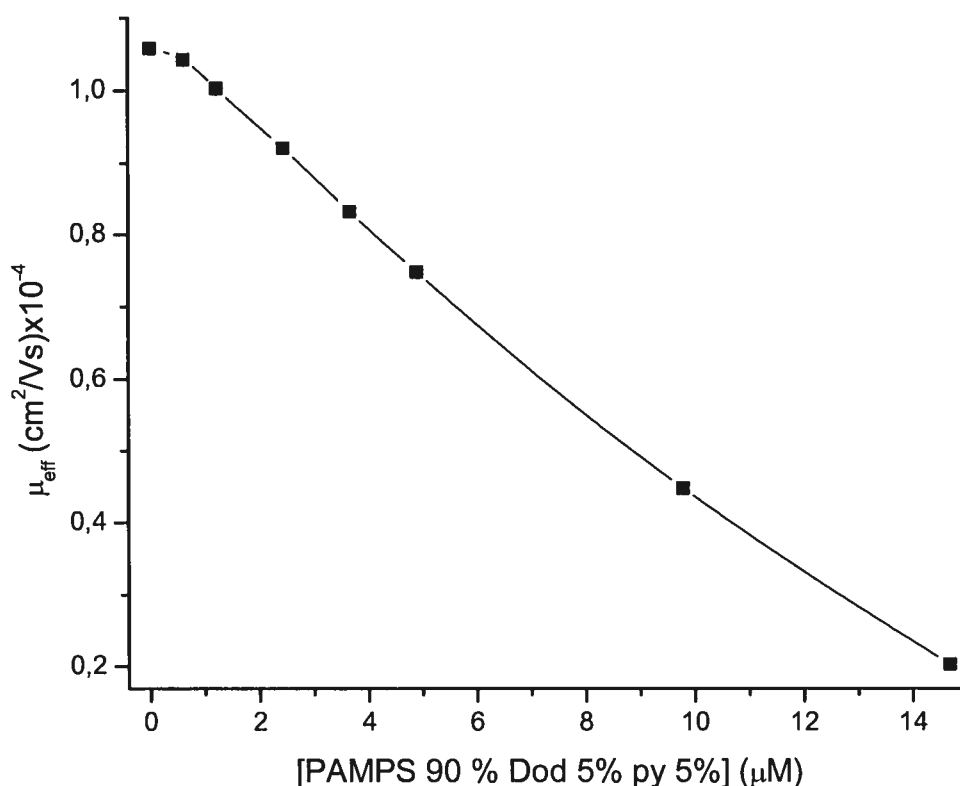


Figure 5.3 Variation de la mobilité effective de la Leu-enképhaline avec la concentration de PAMPS 90% Dod 5% py 5% dans les conditions : tampon phosphate I = 110 mM, pH 2,0, 11 kV, 25°C. Les erreurs sont de la même taille que les points de donnée.

Une régression linéaire a donc été effectuée sur les cinq points représentant les concentrations les plus élevées. La constante d'association apparente obtenue avec PAMPS 90% Dod 5% py 5% est $1500 \pm 800 \text{ M}^{-1}$ pour Leu-Phe et $9000 \pm 3000 \text{ M}^{-1}$ pour la Leu-enképhaline. La précision de ces constantes est très mauvaise. La cause de cela se situe possiblement au niveau de l'incertitude sur

l'ordonnée à l'origine (près de 30 et 50 % pour Leu-Phe et Leu-enképhaline respectivement) qui sert à calculer K_{as} à partir de l'équation 2.2. Elle a en effet une valeur très petite qui se rapproche beaucoup de zéro, ce qui explique l'importante incertitude dont elle est affublée (voir figure 5.3).

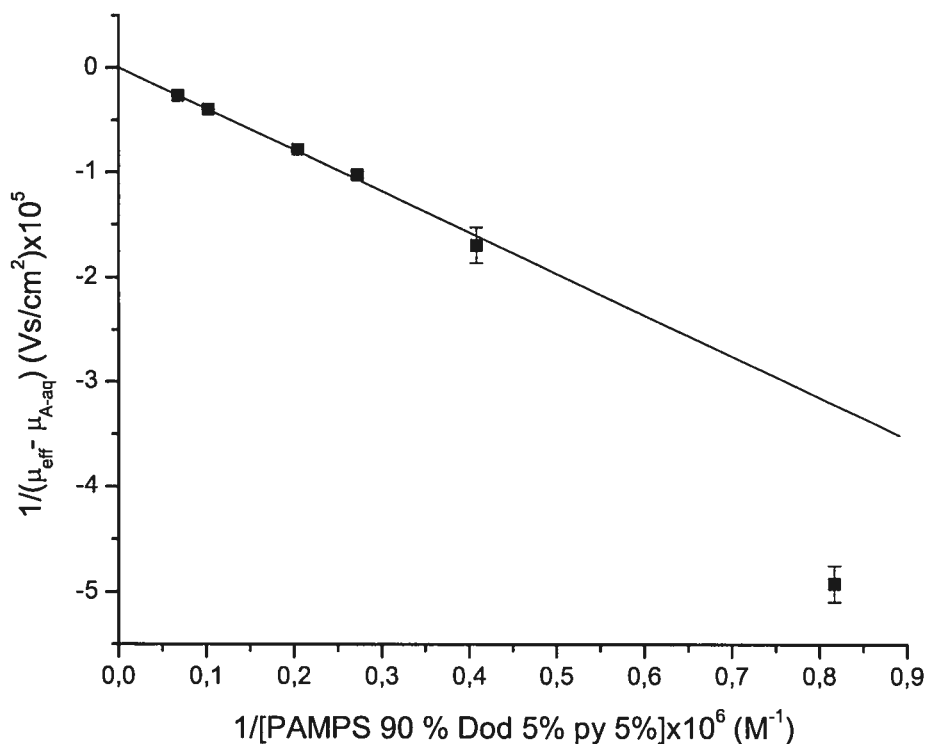


Figure 5.4 Tracé de la fonction inverse pour le système PAMPS 90% Dod 5% py 5%-Leu-Phe. L'équation de la régression linéaire simple est : $y = -0,380 x + 600$. Le coefficient de corrélation de la droite est 0,9997 et $F = 195$ (la valeur critique est : $F_{1,4} = 225$ ($P = 0.05$)).

En ce qui concerne PAMPS 80% Dod 15% py 5%, des ordonnées à l'origine positives ont été obtenues à partir des données provenant de ses interactions avec les deux peptides mentionnés précédemment. Étant donné que K_{as} est le résultat de la division de l'ordonnée à l'origine par la pente et que cette dernière est négative, il est impossible d'obtenir une constante d'association valide. D'autre part, l'ordonnée à l'origine s'approche aussi très près de zéro et son incertitude est du même ordre de grandeur. Le modèle chimique utilisé pour les micelles n'est donc pas utilisable dans le cas des copolymères, puisque pour

avoir une ordonnée à l'origine nulle, μ_{A-C} devrait tendre vers l'infini ce qui ne correspond pas du tout au comportement attendu.

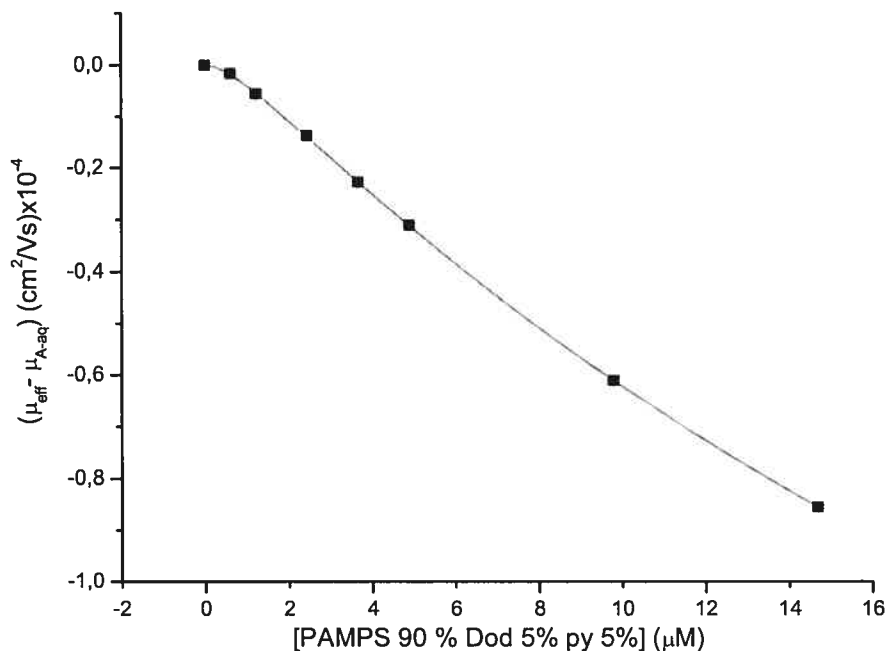


Figure 5.5 Régression non-linéaire pour le système Leu-enképhaline-PAMPS 90% Dod 5% py 5% dans les conditions : tampon phosphate I = 110 mM, pH 2,0, 11 kV, 25°C. Les points (■) apparaissant sur le graphique représentent les données expérimentales, tandis que la courbe représente la régression non-linéaire effectuée selon l'équation 5.2. Le coefficient de corrélation de la courbe est 0,99999 et $F = 18240$ (la valeur critique est : $F_{4,4} = 6,4$ ($P = 0.05$)).

Étant donné la taille importante des copolymères par rapport à celles des peptides, ainsi que la possibilité d'avoir plusieurs microdomaines hydrophobes dans le même polymère, la stœchiométrie 2:1 a donc été envisagée pour décrire l'association peptide-copolymères. La régression non linéaire effectuée à partir du modèle chimique proposé par Galbusera et al.[29] ne correspondait toutefois pas parfaitement aux données. Deux modèles décrivant des interactions 1:2 ont été considérés[29, 86] et c'est celui représenté par l'équation 5.2 qui semble le mieux décrire le phénomène. La figure 5.5 montre le résultat de la régression non-linéaire.

La valeur parfaite du coefficient de corrélation et le F statistique très élevé ($5,878 \times 10^{30}$) obtenues pour le système PAMPS 80% Dod 15% py 5%-Leu-enképhaline sont probablement due au nombre restreint de points utilisés pour faire la régression (5 points comparativement à 8 utilisés dans les autres systèmes étant donné que dans le premier cas, le pic du peptide se perdait dans la ligne de base à concentration élevée de polymère). Les coefficients sont toutefois un peu moins bons dans le cas de Leu-Phe (0,9995 et 0,9998 pour Dod 5% et 15 % respectivement), mais ils restent tout de même excellents. Cette tendance est aussi observée pour les F statistiques (2542 et 2127 pour Dod 5% et 15 % respectivement ce qui est beaucoup plus grand que la valeur critique qui est : $F_{4,4} = 6,4$ ($P = 0.05$)).

Afin d'effectuer une analyse statistique approfondie[87], l'équation 5.2 a été réarrangée afin d'obtenir :

$$(\mu_{eff} - \mu_{A-aq}) = (\mu_{A-C} - \mu_{A-aq})K_{as1}[C] + (\mu_{A-C_2} - \mu_{A-aq})K_{as1}K_{as2}[C]^2 + K_{as1}[C](\mu_{eff} - \mu_{A-aq}) + K_{as1}K_{as2}[C]^2(\mu_{eff} - \mu_{A-aq}) \quad (5.3)$$

L'analyse statistique de ces données soulève toutefois quelques questions. Dans le cas où la Leu-enképhaline interagit avec PAMPS 90% Dod 5% py 5% par exemple, F obtenu par analyse ANOVA est égal à 72820 pour le facteur [C] tandis qu'il est égal à 18240 pour l'ensemble du modèle. De plus, la valeur de F est respectivement 32, 60 et 40 (plus grand que la valeur critique qui est : $F_{1,7} = 5,6$ ($P = 0.05$)) pour les facteurs $[C]^2$, $[C](\mu_{eff} - \mu_{A-aq})$ et $[C]^2(\mu_{eff} - \mu_{A-aq})$, ce qui indique que les coefficients de ces paramètres sont différents de zéro. Mais comme ces valeurs sont très différentes de celle du paramètre [C], il est clair que le paramètre [C] est principalement responsable des variations observées dans le paramètre $(\mu_{eff} - \mu_{A-aq})$. Ceci indique que l'addition des autres paramètres présents dans l'équation 5.3 détériore le modèle linéaire représenté par :

$$(\mu_{eff} - \mu_{A-aq}) = (\mu_{A-C} - \mu_{A-aq})K_{as}[C] \quad (5.4)$$

Une régression utilisant ce modèle chimique donne toutefois une valeur de μ_{A-C} ($-3,74 \times 10^7 \text{ cm}^2/\text{Vs}$) n'ayant aucun sens. De plus en ce qui concerne K_{as} , la valeur

obtenue apparaît beaucoup trop petite ($1,5941 \times 10^{-13} \text{ M}^{-1}$). Il semble donc que l'association est plus complexe que ce qui est proposé par le modèle chimique ayant une stœchiométrie 1 : 2. Cette observation est aussi faite dans l'étude de l'association entre la Leu-Phe et le deux copolymères d'intérêt.

L'analyse de la mobilité des différentes espèces associées (voir tableau 5.2) obtenue par régression non-linéaire, donne certains indices sur le mécanisme d'association. En effet, μ_{A-C} est toujours presque égal à μ_{A-aq} ($\mu_{A-aq} = (1,574 \pm 0,008) \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$ pour Leu-Phe et $1,058 \pm 0,004) \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$ pour la Leu-enképhaline), quel que soit le système. Il y a donc deux possibilités : d'une part les peptides s'associent entre eux (conservation du même rapport charge/masse), d'autre part le modèle chimique n'est pas tout à fait adapté au phénomène qui se produit entre les peptides et les copolymères. En effet, il est possible que les faibles concentrations de polymère utilisées (de l'ordre des μM) par rapport à celle des peptides (0,2 mM) explique que ce système ne réponde pas au modèle proposé pour les surfactants qui étaient utilisés en excès par rapport aux peptides (plus grand que 10 mM). Il est aussi possible que la polydispersité des polymères interfère à la détermination des constantes d'association apparentes.

Tableau 5.2 Mobilités des espèces associées des différents systèmes copolymère-peptide estimées par régression non-linéaire^a

	PAMPS 90% Dod 5% py 5%		PAMPS 80% Dod 15% py 5%	
	μ_{A-C} (cm^2/Vs)	μ_{A-C2} (cm^2/Vs)	μ_{A-C} (cm^2/Vs)	μ_{A-C2} (cm^2/Vs)
Leu-Phe	$(1,593 \pm 0,004) \times 10^{-4}$	$(-9 \pm 7) \times 10^{-5}$	$(1,62 \pm 0,01) \times 10^{-4}$	$(-9 \pm 2) \times 10^{-4}$
Leu-enképhaline	$(1,071 \pm 0,006) \times 10^{-4}$	$(-2,1 \pm 0,1) \times 10^{-4}$	$(9,57 \pm 0,05) \times 10^{-5}$	$(-9,34 \pm 0,06) \times 10^{-5}$

^a 24 mesures ont été effectuées (8 concentrations différentes en copolymère utilisées), sauf dans le cas du système PAMPS 80% Dod 15% py 5%-Leu-enképhaline où 15 mesures ont été utilisées (5 concentrations différentes en copolymère).

L'étude des μ_{A-C2} permet d'affirmer que le polymère a bel et bien une charge négative et ce même à pH 2,0. Il semble que la mobilité de AC_2 dépend

du peptide utilisé. En effet, μ_{A-C2} varie d'un ordre de grandeur lorsque deux peptides différents sont comparés entre eux en présence du même polymère ou lorsque la μ_{A-C2} d'un peptide est comparée à sa valeur en présence de l'autre copolymère. L'influence de la mobilité du peptide sur celle des espèces associées ne serait donc pas négligeable.

Le tableau 5.3 montre les constantes d'association obtenues à partir de l'équation 5.2. Les K_{as1} obtenus entre Leu-Phe et les deux copolymères utilisés ont un ordre de grandeur qui semble exagéré (10^{46} M^{-1}), tandis que la Leu-enképhaline a des valeurs qui se rapprochent de celles présentées dans la littérature pour ce type de système (de l'ordre de 10^6 M^{-1})[17]. Ce constat est probablement un autre indice que le modèle chimique n'est pas tout à fait approprié, surtout dans le cas de la Leu-Phe.

Tableau 5.3 Constantes d'association apparente peptide-copolymère déterminées à partir du modèle utilisant les interactions 1:1 et 1:2 simultanément^a

Analyte	PAMPS 90% Dod 5% py 5%		PAMPS 80% Dod 15% py 5%	
	$K_{as1} (\text{M}^{-1})$	$K_{as2} (\text{M}^{-1})$	$K_{as1} (\text{M}^{-1})$	$K_{as2} (\text{M}^{-1})$
Leu-Phe	$(3,60 \pm 0,06) \times 10^{46}$	$(1,2 \pm 0,4) \times 10^4$	$(2,45 \pm 0,03) \times 10^{46}$	$(8 \pm 2) \times 10^3$
Leu-enképhaline	$(1,2 \pm 0,3) \times 10^6$	$(2,7 \pm 0,2) \times 10^4$	$(1,135 \pm 0,006) \times 10^5$	$(3,87 \pm 0,02) \times 10^5$

^a 24 mesures ont été effectuées (8 concentrations différentes en copolymère utilisées), sauf dans le cas du système PAMPS 80% Dod 15% py 5%-Leu-enképhaline où 15 mesures ont été utilisées (5 concentrations différentes en copolymère).

D'autre part, la comparaison des K_{as2} de Leu-Phe semble indiquer que les interactions électrostatiques jouent un rôle majeur, puisque la valeur de la constante apparente obtenue en présence de PAMPS 80% Dod 15% py 5% ($(8 \pm 2) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$) est plus petite que celle obtenue avec PAMPS 90% Dod 5% py 5% ($(1,2 \pm 0,4) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$). Cette tendance est la même pour les K_{as1} de la Leu-enképhaline. Les K_{as2} de ce peptide ont toutefois le comportement inverse, c'est-à-dire qu'ils semblent augmenter avec le pourcentage de monomère hydrophobe du copolymère. Il y aurait donc vraisemblablement présence d'effet hydrophobe

qui serait beaucoup plus important dans le cas de la Leu-enképhaline que dans le cas de Leu-Phe. Ce phénomène est explicable par la présence, dans la Leu-enképhaline, d'un résidu hydrophobe additionnel (Tyr), ce qui donnerait lieu à des interactions supplémentaires (similaire à ce qui a été observé au chapitre 4, entre les enképhalines et le CTAB).

Malgré le fait que le modèle chimique représenté par l'équation 5.2 s'est révélé être le meilleur de ceux qui sont présents dans la littérature, il semble tout de même y avoir quelques problèmes au niveau des valeurs obtenues par régression non-linéaire. Le changement de conformation du copolymère est peut-être responsable de cette divergence, puisqu'il aurait un effet sur la mobilité du peptide en présence de faible concentration de polymère.

5.4 Conclusion

Le pH joue un rôle très important dans l'association entre les copolymères formés de AMPS, Dod et py et les peptides, puisque tous les polymères utilisés ont des groupements sensibles au pH. Il en résulte la modification de la sélectivité des polymères, ainsi que la modification de la charge sur les peptides, permettant ainsi la formation d'interactions électrostatiques. D'autre part, l'élargissement important des pics de peptides se produisant avec l'augmentation de la concentration en polymère, constitue un problème important, puisqu'il diminue la gamme de concentrations de copolymère utilisable, en plus de nuire à leur utilisation comme phase pseudo-stationnaire. Ce problème pourrait éventuellement être réglé par l'inversion du potentiel de séparation. Dans le cas où l'élargissement serait causé par la cinétique lente d'association-dissociation, le peptide aurait alors plus de temps pour atteindre un équilibre dynamique avec le copolymère. Il y aurait alors un plus grand écart entre le temps de la séparation et le taux de la réaction, ce qui pourrait théoriquement réduire l'effet d'élargissement des pics.

D'autre part, il a été démontré que l'association entre ce type de polymère et des peptides se produit à un ordre d'équilibre plus élevé que ce qui a été observé avec les micelles de SDS et de CTAB (1:1). Plusieurs modèles décrivant

des interactions multiples ont été évalués et c'est finalement le modèle développé par Bowser et al. qui a été choisi. Ce dernier montre une excellente corrélation avec les données expérimentales, toutefois certaines des valeurs obtenues à partir des régressions non-linéaires avaient des ordres de grandeur beaucoup trop grands pour être significatives. Il faudrait donc investiguer plus en profondeur le changement probable de conformation du polymère, afin de déterminer ce qui se produit vraiment et de connaître la concentration critique auquel il se produit. Des concentrations plus élevées que la valeur critique pourraient alors être utilisées dans la détermination de constantes d'association de façon analogue à ce qui a été fait avec les micelles. Il serait aussi nécessaire d'utiliser un facteur de correction de la viscosité, puisqu'il a été démontré que cette dernière varie en fonction de la concentration en polymère. Une étude spectrophotométrique pourrait aussi confirmer la présence d'interactions d'ordre supérieur.

Afin de mieux comprendre les résultats préliminaires présentés dans ce chapitre, une étude similaire portant sur des copolymères de AMPS et de Dod seulement, pourrait potentiellement simplifier les interactions avec les peptides et permettre de mieux comprendre le mécanisme d'association des peptides en présence des polymères comprenant des monomères py. Dans le même ordre d'idée, il serait aussi intéressant d'utiliser PAMPS 95% py 5% et même PAMPS 100%. De cette façon, il serait plus facile d'identifier la contribution de chacun des monomères au cours de l'association avec des peptides et ainsi trouver la phase pseudo-stationnaire la plus efficace.

6. Conclusion générale

6.1 Conclusion

La chromatographie électrocinétique (EKC) jouit d'une popularité grandissante dans l'industrie pharmaceutique et biotechnologique à cause, entre autre, de son grand potentiel à résoudre les mélanges de peptides analogues[47, 88]. Nous nous sommes donc proposés d'approfondir la compréhension du mécanisme d'association peptides-micelles, que ces dernières soient conventionnelles ou polymériques.

La comparaison des constantes d'association obtenues par MEKC et par spectrophotométrie d'absorption faite au chapitre 2, a fourni beaucoup d'information sur le mécanisme d'association, ainsi que sur les techniques utilisées. La MEKC s'est révélée plus précise, tandis que la spectrophotométrie souffrait d'une incertitude importante causée par le processus de dérivation et le très faible déplacement du maximum de longueur d'onde en fonction de la concentration en surfactant. Les constantes provenant des deux techniques se sont avérées très semblables dans le cas de l'étude des systèmes Leu-Phe-micelles. En ce qui concerne les enképhalines en présence de micelles de SDS, leurs constantes estimées par les deux techniques sont très proches l'une de l'autre. Toutefois, lorsque les peptides sont en présence de CTAB, les constantes obtenues par spectroscopie sont près de deux fois plus grandes que celles calculées par MEKC. Cette technique semble donc plus influencée par les interactions électrostatiques que nous tentions d'éviter au départ en choisissant un pH auquel les peptides auraient la même charge globale que les surfactants. D'autre part, les deux techniques ont estimé que l'association des enképhalines était un ordre de grandeur plus élevé avec les micelles de CTAB qu'avec les micelles de SDS. Les données spectroscopiques ont montré que de fortes interactions hydrophobes en seraient la cause. Toutefois, il semble que la surface chargée des micelles ait joué un rôle plus important qu'initialement anticipé dans ce phénomène.

Les systèmes micellaires conventionnels ont d'abord été caractérisés, afin d'identifier et de minimiser les causes d'erreurs et d'éviter l'utilisation de

concentrations prémicellaires lors de la détermination des K_{as} . L'effet de la dégradation du SDS sur la mobilité effective du peptide a donc été évalué. Une étude de la variation de ce paramètre en fonction du temps a révélé que l'hydrolyse du SDS cause une diminution de la mobilité effective, puisque les produits de la réaction modifient la nature des micelles et le pH de la solution tampon. Il y a donc fort probablement un effet sur les données expérimentales qui les fait dévier du modèle chimique.

Les différents paramètres de micellisation ont ensuite été déterminés dans chacune des conditions utilisées pour les systèmes peptides-micelles. Les valeurs obtenues expérimentalement se sont avérées vraisemblables, puisqu'elles suivent la tendance décrite dans la littérature. Suivant la théorie sur l'effet de la force ionique sur les paramètres de micellisation, nos valeurs de CAC et de CMC se sont révélées plus petites que celles obtenues par Lin et al.[59] qui ont utilisé des tampons (pH = 7) ayant de plus faibles concentrations en phosphate. D'autre part, la concentration c_2 subit l'effet inverse, c'est-à-dire que sa valeur augmente en fonction de la force ionique du tampon. Finalement, un facteur corrigeant pour l'augmentation de la viscosité causée par l'addition de surfactant dans le tampon de séparation a été utilisé dans le modèle chimique décrivant l'association peptides-micelles. La viscosité influençant la mobilité électroosmotique et la mobilité électrophorétique de l'analyte, il est nécessaire d'appliquer une correction, puisque la viscosité subit une influence importante.

En plus de la première dérivée, il est aussi possible d'utiliser la troisième dérivée afin de localiser précisément la longueur d'onde au maximum d'absorbance. Elle a en fait l'avantage de mieux discriminer deux bandes d'absorbance qui se superposent partiellement, comme c'est le cas pour les bandes provenant de Phe et de Tyr dans le spectre de la Met-enképhaline. La 3^e dérivée a donc été utilisée pour déterminer individuellement les constantes d'association à partir du déplacement de λ_{max} des ces deux acides aminés aromatiques. La tâche est toutefois plus ardue avec cette dérivée, puisque le bruit de fond est beaucoup plus important que celui obtenu avec la première dérivée. Il en résulte donc une incertitude importante sur les constantes d'association. Cette

étude a montré que la Tyr semblait demeurer à la surface des micelles lors des interactions entre la Met-enképhaline et le CTAB, tandis que la Phe était incluse dans la phase micellaire. Lorsque le peptide est en présence de SDS, aucune insertion du peptide n'est suggérée par l'étude spectroscopique, toutefois il semble qu'il existe tout de même des interactions Met-enképhaline-SDS qui se situent sûrement à la surface des micelles, puisqu'un déplacement du λ_{max} de Tyr et Phe est observé. Il semble que ce déplacement soit causé par le repliement du peptide qui opte alors pour une conformation préférentielle. Les valeurs des constantes d'association obtenues pour ce système semblent donc indiquer que Tyr se retrouve dans un environnement plus hydrophobe causé par le repliement du peptide, tandis que Phe est plus exposé au solvant tout en participant activement à la stabilisation de la conformation préférentielle.

L'utilisation de copolymère formé de AMPS, Dod et py en tant que phase pseudo-stationnaire en EKC offre des possibilités intéressantes. Son mécanisme d'association avec des peptides est toutefois très différent de celui observé avec les micelles conventionnelles. La rigidité des microdomaines hydrophobes des copolymères, par opposition à la flexibilité des structures micellaires, à l'équilibre des surfactants conventionnels, en est assurément la cause. Les répulsions électrostatiques empêchent donc toute interaction copolymère-peptide. Afin d'observer un déplacement de la mobilité, il faut donc les éliminer entièrement en choisissant un pH approprié. La modification de ce paramètre peut toutefois affecter potentiellement la sélectivité du copolymère, puisque les groupements sulfate qu'il comporte sont protonnables. Un modèle chimique correspondant aux données expérimentales a ensuite été trouvé dans la littérature[28], puis utilisé afin de déterminer les constantes d'association. Selon ce modèle il se produirait des interactions peptide-copolymère 1:1 et 1:2. Les coefficients de corrélation sont excellents, mais les valeurs ont des ordres de grandeur beaucoup trop grands pour être significatifs, ce qui suggère une certaine inaptitude qu'aurait le modèle chimique à décrire le phénomène. Il semble toutefois ressortir de cette étude préliminaire que les interactions électrostatiques sont majoritaires.

6.2 Directions futures

Au chapitre 3, une étude de l'influence de l'hydrolyse du SDS a été réalisée pour évaluer qualitativement si la dégradation du surfactant avait une influence sur la mobilité effective du peptide, cette dernière servant à déterminer la constante d'association des systèmes peptide-micelle conventionnelle. Il serait intéressant de développer une méthode permettant de corriger la mobilité des peptides en tenant compte de l'hydrolyse, c'est-à-dire en ramenant la mobilité à un niveau de dégradation de SDS s'approchant de zéro. L'élimination de cette cause d'erreur donnerait alors une constante d'association beaucoup plus rigoureuse. Il est possible que l'application de ce facteur permette d'amenuiser les différences existant entre les K_{as} obtenues par CE et par spectrophotométrie d'absorption.

En ce qui concerne la détermination des constantes d'association peptide-micelle conventionnelle présentée aux chapitres 2 et 4, la RMN pourrait être utilisée afin de confirmer la conformation du peptide dans les mêmes conditions expérimentales utilisées en CE et en spectrophotométrie. D'autres techniques analytiques, comme la calorimétrie différentielle ou la chromatographie liquide, pourraient aussi nous aider à évaluer si la MEKC ou la spectroscopie différentielle est faussée. D'autre part la 3^e dérivée semble très intéressante à cause de son pouvoir de résolution des bandes provenant des acides aminés aromatiques. Il serait donc intéressant d'utiliser un peptide composé de Trp en plus de Tyr et de Phe, afin de voir si cette technique peut résoudre les bandes d'absorbance de ces trois acides aminés aromatiques.

Les micelles conventionnelles ayant déjà atteint certaines limites en tant que phase pseudo-stationnaire en CE et l'électrochromatographie capillaire posant certains problèmes au niveau de l'introduction et de la fixation d'une phase stationnaire uniforme dans le capillaire, les polymères solubles ont donc été utilisés afin de pallier aux faiblesses de ces deux techniques. L'étude décrite au chapitre 5 a montré que les copolymères de la famille PAMPS Dod py ont un grand potentiel en CE. Leur utilisation comme phase pseudo-stationnaire dans la séparation de peptide souffre toutefois d'un important élargissement des pics

d'analyte. Il serait donc intéressant d'inverser le potentiel de séparation, ce qui permettrait d'atteindre l'équilibre dynamique entre les peptides et le copolymère. Il serait aussi intéressant d'utiliser des polymères ayant des structures analogues à celles déjà utilisées, par exemple des PAMPS Dod ou même des PAMPS. Cette étude comparative permettrait de déterminer la contribution de chacun des monomères dans le phénomène d'association. Il serait aussi primordial de trouver un modèle chimique décrivant parfaitement le phénomène afin d'obtenir des K_{as} significatifs. Les constantes découlant de ces études pourraient ensuite être utilisées afin de modifier la structure du copolymère et ainsi obtenir la meilleure phase pseudo-stationnaire possible.

7. Références

- [1] Y. Tanaka and S. Terabe *J. Chromatogr. B* 2002, 768, 81-92.
- [2] D. Picone, A. D'Ursi, A. Motta, T. Tancredi, and P. A. Temussi *Eur. J. Biochem.* 1990, 192, 433-439.
- [3] W. H. Graham, E. S. Carter, 2nd, and R. P. Hicks *Biopolymers* 1992, 32, 1755-1764.
- [4] R. P. Hicks, D. J. Beard, and J. K. Young *Biopolymers* 1992, 32, 85-96.
- [5] S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, and T. Ando *Anal. Chem.* 1984, 56, 111-113.
- [6] B. Maichel and E. Kenndler *Electrophoresis* 2000, 21, 3160-3173.
- [7] C. P. Palmer *J. Chromatogr. A* 1997, 780, 75-92.
- [8] C. P. Palmer and N. Tanaka *J. Chromatogr. A* 1997, 792, 105-124.
- [9] J. L. Xia, P. L. Dubin, Y. Morishima, T. Sato, and B. B. Muhoberac *Biopolymers* 1995, 35, 411-418.
- [10] T. Sato, K. W. Mattison, P. L. Dubin, M. Kamachi, and Y. Morishima *Langmuir* 1998, 14, 5430-5437.
- [11] T. Hattori, K. Kimura, E. Seyrek, and P. L. Dubin *Anal. Biochem.* 2001, 295, 158-167.
- [12] T. Hattori, R. Hallberg, and P. L. Dubin *Langmuir* 2000, 16, 9738-9743.
- [13] R. K. Hallberg and P. L. Dubin *J. Phys. Chem. B* 1998, 102, 8629-8633.
- [14] J. Y. Gao and P. L. Dubin *Biopolymers* 1999, 49, 185-193.
- [15] J. Y. Gao, P. L. Dubin, and B. B. Muhoberac *J. Phys. Chem. B* 1998, 102, 5529-5535.
- [16] J. Y. Gao, P. L. Dubin, and B. B. Muhoberac *Anal. Chem.* 1997, 69, 2945-2951.
- [17] F. Progent, M. Taverna, I. Le Potier, F. Gopee, and D. Ferrier *Electrophoresis* 2002, 23, 938-944.
- [18] W. Shi, D. S. Peterson, and C. P. Palmer *J. Chromatogr. A* 2001, 924, 123-135.
- [19] W. Shi, C. J. Watson, and C. P. Palmer *J. Chromatogr. A* 2001, 905, 281-290.

- [20] W. Shi and C. P. Palmer *J. Sep. Sci.* 2002, 25, 543-546.
- [21] W. Shi and C. P. Palmer *Electrophoresis* 2002, 23, 1285-1295.
- [22] X. J. Peng, M. T. Bowser, P. Britzmckibbin, G. M. Bebault, J. R. Morris, and D. D. Y. Chen *Electrophoresis* 1997, 18, 706-716.
- [23] X. J. Peng, G. M. Bebault, S. L. Sacks, and D. D. Y. Chen *Can. J. Chem.* 1997, 75, 507-517.
- [24] A. R. Kranack, M. T. Bowser, P. Britzmckibbin, and D. D. Y. Chen *Electrophoresis* 1998, 19, 388-396.
- [25] M. T. Bowser and D. D. Y. Chen *Electrophoresis* 1998, 19, 383-387.
- [26] M. T. Bowser, G. M. Bebault, X. J. Peng, and D. D. Y. Chen *Electrophoresis* 1997, 18, 2928-2934.
- [27] M. T. Bowser, E. D. Sternberg, and D. D. Y. Chen *Electrophoresis* 1997, 18, 82-91.
- [28] M. T. Bowser and D. D. Y. Chen *Anal. Chem.* 1998, 70, 3261-3270.
- [29] C. Galbusera, M. Thachuk, E. De Lorenzi, and D. D. Y. Chen *Anal. Chem.* 2002, 74, 1903-1914.
- [30] C. Galbusera and D. D. Y. Chen *Current Opinion Biotech.* 2003, 14, 126-130.
- [31] K. L. Rundlett and D. W. Armstrong *Electrophoresis* 1997, 18, 2194-2202.
- [32] K. L. Rundlett and D. W. Armstrong *Electrophoresis* 2001, 22, 1419-1427.
- [33] A. Fürtös-Matei, "PhD Thesis," in *Department of Chemistry: Université de Montréal*, 2000.
- [34] H. A. Benesi and J. H. Hildebrand *J. Am. Chem. Soc.* 1949, 71, 2703-2707.
- [35] G. A. Woolley and C. M. Deber *Biopolymers* 1987, 26 Suppl, S109-S121.
- [36] J. K. Young, W. H. Graham, D. J. Beard, and R. P. Hicks *Biopolymers* 1992, 32, 1061-1064.
- [37] K. A. Connors *Binding Constants: The Measurement of Molecular Complex Stability*; John Wiley & Sons, 1987.

- [38] L. L. Lu and P. Lundahl *J. Chromatogr. A* 1996, 741, 49-57.
- [39] D. S. Hage and S. A. Tweed *J. Chromatogr. B* 1997, 699, 499-525.
- [40] K. R. Deaton, E. A. Feyen, H. J. Nkulabi, and K. F. Morris *Magn. Reson. Chem.* 2001, 39, 276-282.
- [41] K. Hirose *J. Incl. Phenom. Macro. Chem.* 2001, 39, 193-209.
- [42] M. Iwatsuru and K. Shimizu *Chem. Pharm. Bull.* 1986, 34, 3348-53.
- [43] T. Imamura and K. Konishi *J. Colloid Interface Sci.* 1998, 198, 300-307.
- [44] K. L. Rundlett and D. W. Armstrong *J. Chromatogr.* 1996, 721, 173-186.
- [45] K. Otsuka, S. Terabe, and T. Ando *J. Chromatogr.* 1985, 332, 219-226.
- [46] J. Liu, K. A. Cobb, and M. Novotny *J. Chromatogr.* 1990, 519, 189-197.
- [47] A. Fürtös-Matei, J. J. Li, and K. C. Waldron *J. Chromatogr. B* 1997, 695, 39-47.
- [48] J. W. Donovan *J. Biol. Chem.* 1969, 244, 1961-1967.
- [49] I. M. Klotz and D. L. Hunston *Biochemistry* 1971, 10, 3065-3069.
- [50] M. Iwatsuru and K. Shimizu *Chem. Pharm. Bull.* 1986, 34, 4862-4865.
- [51] K. Shimizu and M. Iwatsuru *Chem. Pharm. Bull.* 1988, 36, 726-731.
- [52] L. Orfi, M. F. Lin, and C. K. Larive *Anal. Chem.* 1998, 70, 1339-1345.
- [53] J. P. Foley *Anal. Chim. Acta* 1990, 231, 237-247.
- [54] J. N. Miller and J. C. Miller *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*; Pearson Education Limited, 2000.
- [55] J. Kyte and R. Doolittle *J. Mol. Biol.* 1982, 157, 105-132.
- [56] D. Bethell, R. E. Fessey, E. Namwindwa, and D. W. Roberts *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* 2001, 1489-14.
- [57] E. M. Ebeid *J. Chem. Edu.* 1985, 62, 165-166.
- [58] D. G. Davies and C. R. Bury *J. Chem. Soc.* 1930, 2263-2270.
- [59] C. E. Lin, M. J. Chen, H. C. Huang, and H. W. Chen *J. Chromatogr. A* 2001, 924, 83-91.
- [60] M. I. Gjerde, W. Nerdal, and H. Hoiland *Colloid Polym. Sci.* 1998, 276, 503-510.
- [61] M. I. Gjerde, W. Nerdal, and H. Hoiland *J. Colloid Interface Sci.* 1998, 197, 191-197.

- [62] C. E. Lin and K. S. Lin *J. Chromatogr. A* 2000, 868, 313-316.
- [63] K. Shimizu and M. Iwatsuru *Chem. Pharm. Bull.* 1988, 36, 4055-4059.
- [64] A. Cifuentes, J. L. Bernal, and J. C. Diezmasa *Anal. Chem.* 1997, 69, 4271-4274.
- [65] C. E. Lin, T. Z. Wang, T. C. Chiu, and C. C. Hsueh *J. High Resolut. Chromatogr.* 1999, 22, 265-270.
- [66] E. Fuguet, C. Rafols, E. Bosch, and M. Roses *Langmuir* 2003, 19, 55-62.
- [67] Z. Adamczyk, G. Para, and P. Warszynski *Langmuir* 1999, 15, 8383-8387.
- [68] M. A. Taher *Anal. Sci.* 2000, 16, 501-506.
- [69] F. Fenaille, P. Mottier, R. J. Turesky, S. Ali, and P. A. Guy *J. Chromatogr. A* 2001, 921, 237-245.
- [70] M. A. Taher *Anal. Chim. Acta* 2000, 408, 153-161.
- [71] A. El-Gindy, A. Ashour, L. Abdel-Fattah, and M. M. Shabana *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2001, 25, 923-931.
- [72] R. Lipka, M. Sobczak, S. Kus, S. Oszwaldowski, and M. Jarosz *Microchemical Journal* 2000, 65, 51-58.
- [73] T. Owen *Fundamentals of Modern UV-visible Spectroscopy*; Hewlett-Packard, 1996.
- [74] Q. Q. Luthi-Peng and Z. Puhan *Anal. Chim. Acta* 1999, 393, 227-234.
- [75] D. J. Fletouris, N. A. Botsoglou, G. E. Papageorgiou, and A. J. Mantis *J. AOAC Internat.* 1993, 76, 1168-1173.
- [76] M. R. Bray, A. D. Carriere, and A. J. Clarke *Anal. Biochem.* 1994, 221, 278-284.
- [77] T. L. Whitehead, L. M. Jones, and R. P. Hicks *Biopolymers* 2001, 58, 593-605.
- [78] T. Noda and Y. Morishima *Macromolecules* 1999, 32, 4631-4640.
- [79] H. Yamamoto and Y. Morishima *Macromolecules* 1999, 32, 7469-7475.
- [80] H. Yamamoto, M. Mizusaki, K. Yoda, and Y. Morishima *Macromolecules* 1998, 31, 3588-3594.

- [81] H. Yamamoto, I. Tomatsu, A. Hashidzume, and Y. Morishima *Macromolecules* 2000, 33, 7852-7861.
- [82] H. Yamamoto, A. Hashidzume, and Y. Morishima *Polym. J.* 2000, 32, 745-752.
- [83] A. Hashidzume, M. Mizusaki, K. Yoda, and Y. Morishima *Langmuir* 1999, 15, 4276-4282.
- [84] R. C. W. Liu, Y. Morishima, and F. M. Winnik *Macromolecules* 2001, 34, 9117-9124.
- [85] K. Otsuka and S. Terabe *Bull. Chem. Soc. Japan* 1998, 71, 2465-2481.
- [86] M. Mammen, F. A. Gomez, and G. M. Whitesides *Anal. Chem.* 1995, 67, 3526-3535.
- [87] M. D'Amboise, : Communication personnelle, 2004.
- [88] A. Fürtös-Matei, R. Day, S. A. St-Pierre, L. G. St-Pierre, and K. C. Waldron *Electrophoresis* 2000, 21, 715-723.